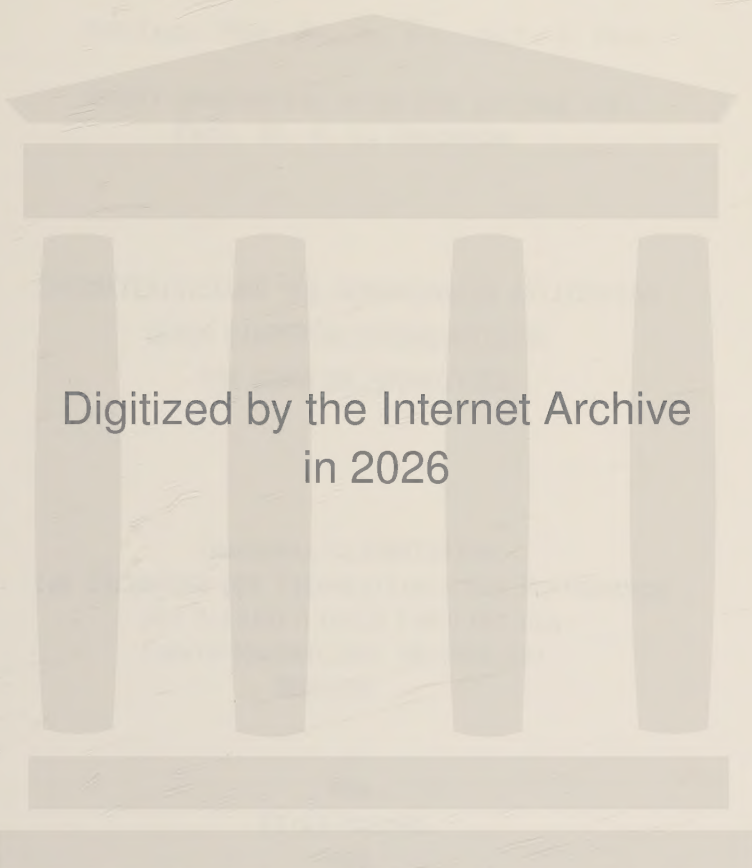
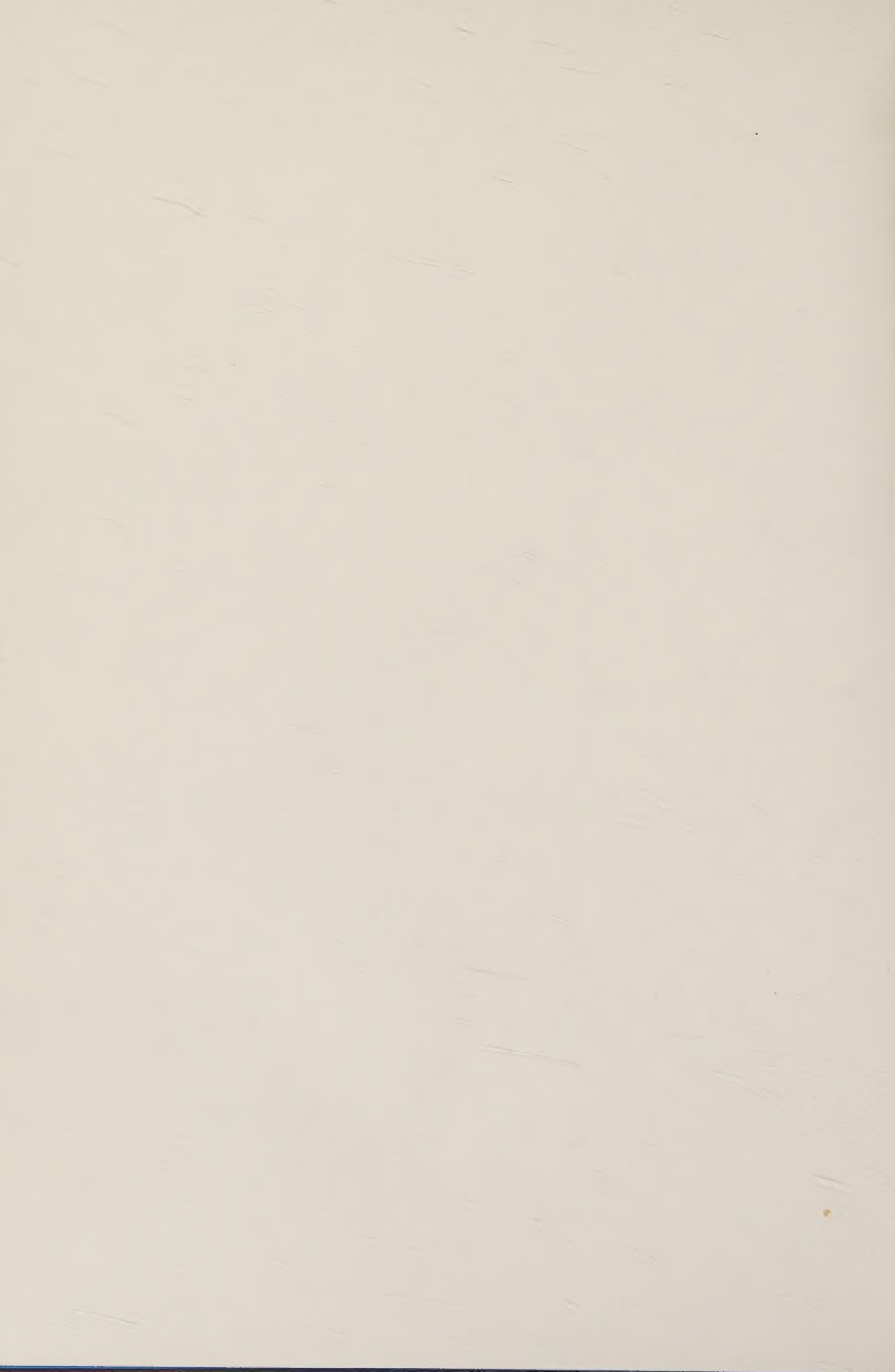


CHARAKTERISIERUNG
VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN
GEGEN DIFFERENZIERUNGSANTIGENE
VON SCHWEINELYMPHOZYTEN

Peter Koeppel



Digitized by the Internet Archive
in 2026



AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE,
INFEKTIONS- UND SEUCHENMEDIZIN
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

VORSTAND: PROF. DR. DR. H.C. MULT, A. MAYR

ARBEIT ANGEFERTIGT UNTER DER LEITUNG VON:
PROF. DR. H. G. BUSCHMANN

CHARAKTERISIERUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN
GEGEN DIFFERENZIERUNGSANTIGENE
VON SCHWEINELYMPHOZYTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER TIERMEDIZINISCHEN DOKTORWÜRDE
DER TIERÄRZTLICHEN FAKULTÄT DER
LUDWIG-MAXIMILIANS UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

VON
PETER KOEPEL
AUS
ERLANGEN

MÜNCHEN 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Korreferent: Prof. Dr. E. Dahme

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Meiner Familie



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Phylognese des Immunsystems	2
2.2 Humorale und zelluläre Immunität	4
2.3 Lymphozytensubpopulationen und ihre Bedeutung	6
2.4 Oberflächenantigene von Lymphozytensubpopulationen	10
2.5 Untersuchungsverfahren zur Lymphozytenfunktionsbestimmung	13
3. MATERIALIEN UND METHODEN	17
3.1 Verzeichnis der regelmäßig verwendeten Materialien	17
3.2 Isolierung von Zellen	19
3.2.1 Gewinnung von Schweinelymphozyten	19
3.2.2 Isolierung von Leukozyten	19
3.2.3 Isolierung von Zellen aus Thymus und Milz	20
3.2.4 Gewinnung von Thrombozyten	20
3.2.5 Gewinnung von Erythrozyten	21
3.3 Produktion Monoklonaler Antikörper	21
3.3.1 Erzeugung von Hybridomzellen	21
3.3.2 Nachweis von MAK gegen Schweinelymphozyten	22
3.3.3 Bestimmung der Ig-Klassen bzw. -Subklassen	23
3.4 Auftrennung von Lymphozytensuspensionen	24
3.4.1 Trennung über Nylonwolle-Säulen	24

	Seite
3.4.2 Trennung von Lymphozyten durch Panning	25
3.4.2.1 Abtrennung der Lymphozyten mit membran- gebundenem Immunglobulin	25
3.4.2.2 Abtrennung von Lymphozyten mit Fc-Rezeptoren	26
3.4.3 Trennung durch E-Rosettensedimentation	26
3.4.4 Abtrennung von Makrophagen	27
3.5 Nachweis von komplementabhängiger Zytotoxi- zität der Monoklonalen Antikörper	27
3.6 Differenzierung der Monoklonalen Antikörper mittels Cytofluorographie	28
3.7 Einfluß der MAK auf Lymphozytenfunktionen in vitro	29
3.7.1 Beeinflussung der mitogenen Stimulierbarkeit	29
3.7.2 Beeinflussung der Mixed Lymphocyte Reaction	31
3.8 Markierung von Con A-Blasten	33
 4. ERGEBNISSE	 34
4.1 Ig-Klassen, -Subklassen und Titer der MAK im Zellkulturüberstand	34
4.2 Markierung von Schweinezellen mit MAK	35
4.2.1 Markierung der peripheren Lymphozyten	35
4.2.2 Markierung verschiedener Zellarten des Schweins	36
4.3 Bindungsvermögen der MAK an Leukozyten anderer Spezies	37
4.4 Bindung der MAK an angereicherte Lympho- zytensubpopulationen	39
4.4.1 Trennung durch E-Rosettensedimentation	39
4.4.2 Trennung durch E-Rosettensedimentation und Panning	41
4.4.3 Trennung durch Nylonwolle und durch Panning	42
4.4.4 Markierung von Makrophagen	43
4.4.5 Markierung von Zellen mit Fc-Rezeptoren	44

	Seite
4.5	Komplementabhängige Zytotoxizität der MAK 45
4.6	Beeinflussung der mitogenen Stimulierbarkeit 47
4.7	Beeinflussung der Mixed Lymphocyte Reaction 47
4.8	Markierung von Con A-Blasten 50
5.	DISKUSSION 51
6.	ZUSAMMENFASSUNG 58
7.	LITERATURVERZEICHNIS 62

1. EINLEITUNG

Seitdem man weiß, daß die Lymphozyten keine einheitliche Population darstellen, hat man große Anstrengungen unternommen, die einzelnen Lymphozytensubpopulationen zu isolieren und zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden sowohl Versuche in vivo als auch in vitro vorgenommen. Dadurch daß jede Subpopulation ihre speziellen Antigene aufweist, kann man heute die meisten Lymphozyten einordnen und ihre Abstammung nachvollziehen.

Die Lymphozytenfunktionen werden dadurch untersucht, daß man z.B. in vitro bestimmte Zellen entfernt und dann die Immunantwort auf ein bestimmtes Antigen untersucht. Für die Abtrennung oder Anreicherung bestimmter Lymphozyten bedient man sich ihrer Oberflächenmarker, d.h. antigener Strukturen auf der Zelloberfläche, die auf bestimmte Weise reagieren; so z.B. die spontane Rosettenbildung von T-Zellen mit Schafererythrozyten oder die Adhärenz von B-Zellen und Makrophagen an Nylonwolle. Zytotoxische polyklonale Immunsereen finden ebenfalls breite Anwendung zur Untersuchung von Lymphozyten.

Ein großer Fortschritt war die Entwicklung von Monoklonalen Antikörpern durch KÖHLER und MILSTEIN (1975), die Myelomzellen mit zuvor immunisierten Plasmazellen fusionierten und so stabile Hybridomzellen erzeugten, die Antikörper nur einer Spezifität produzierten. Für die verschiedensten Zellarten vieler Spezies stehen inzwischen gut definierte MAK zur Verfügung; beim Menschen haben sie Anwendung in Diagnostik, Forschung und auch Therapie gefunden.

Da beim Schwein noch viele Fragen bezüglich des Immunsystems offen sind, sollte versucht werden, mit MAK die einzelnen Lymphozytensubpopulationen zu bestimmen. Für die Charakterisierung der MAK mußte auf die bekannten Verfahren zur Trennung und Anreicherung von Lymphozyten zurückgegriffen werden, um die Spezifitäten der MAK zu definieren.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Phylogenese des Immunsystems

Das Vermögen, zwischen fremden und eigenen Zellen unterscheiden zu können, entwickelt sich frühzeitig auf der Entwicklungsstufe der Hohltiere; die Fähigkeit zur Sekundärantwort tritt bereits bei Stachelhäutern und Würmern auf, die Xeno- und Allotransplantate abzustößen vermögen, während sie Autotransplantate tolerieren. Daher kann man auf dieser Entwicklungsstufe von einer zellulären Immunität sprechen; zu diesem Zeitpunkt der Evolution sind auch spezialisierte Zellen zu erkennen, die die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen und verschiedene antibakterielle Substanzen zu erzeugen vermögen.

Weichtiere und Gliedertiere zeigen, obwohl in der Evolution höherstehend, keine Transplantatabstoßung. Beim Hummer kommen sehr wirksame Bakterizidine gegen Gram-negative und -positive Bakterien vor, die aber ohne Bezug zu dem auslösenden Antigen sind. Eine Homologie dieser Agglutinine mit den Antikörpern der Vertebraten besteht nicht, sie sind aber ebenfalls Glycoproteine. Bei den primitivsten Wirbeltieren, den Tunikaten, tritt ein für die Allotransplantatabstoßung zuständiger, einzelner Genkomplex auf, der dem Histokompatibilitätskomplex zuzurechnen ist.

Ein einschneidender Schritt in der Entwicklung des Immunsystems liegt in dem Auftreten von Antikörpern, die durch ein Individuum nach Kontakt mit einem bestimmten Antigen, von spezialisierten Zellen gebildet werden und spezifisch gegen das auslösende Antigen gerichtet sind. Wenn auch der Aufbau der primitiven Immunglobuline der niederen Vertebraten sich deutlich von dem höherer Vertreter unterscheidet, da die vier Unterheiten noch relativ locker, nicht kovalent und ohne Disulfidbrücken verbunden sind, so kann

man doch gewisse Parallelitäten in der Aminosäuresequenz zwischen der schweren Kette des Immunglobulins vom Neunaugen und den schweren Ketten vom μ -Typ höherer Vertebraten feststellen.

Bei den Knorpelfischen treten Immunglobuline mit einem Molekulargewicht von 900.000 auf, die aus fünf, durch J-Ketten (Joining) verbundenen Untereinheiten bestehen und aus jeweils vier Peptidketten (zwei H- und zwei L-Ketten), über Disulfidbrücken verknüpft, zusammengesetzt sind. Diese Untereinheiten können auch einzeln vorkommen.

Die Knochenfische besitzen im Gegensatz dazu Immunglobuline, die aus vier Untereinheiten bestehen, wobei ebenfalls monomere Formen auftreten.

Für beide Klassen von Fischen scheint aber festzustehen, daß diese unterschiedlichen Formen nur ein Ausdruck unterschiedlichen Polymerisationsgrades sind.

Eine zusätzliche Klasse von Immunglobulinen ist bei den Tieren festzustellen, die den Übergang zum Leben auf dem Lande markieren, den Lungenfischen. Diese neue Klasse von Immunglobulinen, ebenfalls in ihren Untereinheiten aus zwei schweren und zwei leichten Ketten zusammengesetzt, ist leichter als die penta- und tetrameren Formen; zusätzlich sprechen Unterschiede im Gehalt an Kohlenhydraten und Abweichungen in der Antigenität für das Auftreten einer neuen Ig-Klasse. Weitere Entwicklungsstufen sind das Auftreten des Thymus als lymphoides Organ bei den Knorpelfischen, sowie der Plasmazelle, als speziell für die Antikörperproduktion bestimmte Zelle.

Neu für die Klasse der Amphibien ist die allogene Stimulierbarkeit der Lymphozyten (Mixed Lymphocyte Reaction) sowie die Erweiterung des Histokompatibilitätskomplex um die I-Region. Ein bei den Amphibien auftretendes Immunglobulin ist dem bei Vögeln und Reptilien bekannten IgG ähnlich.

Sekretorische Antikörper für den Schutz von inneren und äußeren Schleimhäuten sind bei den Vögeln nachgewiesen und entsprechen damit dem IgA.

Die Bursa Fabricii ist als primäres lymphoides Organ für die Reifung der Plasmazellen beim Vogel zuständig und findet beim Säuger ihr Äquivalent im Knochenmark, wo auch ein Großteil der Antikörperbildung abläuft (BRENNER, 1981). Der höchste Entwicklungsstand wird bei den Säugern erreicht, fünf Klassen von Antikörpern (Isotypen) sind bekannt, die sich alle durch Abweichungen in ihren schweren Ketten sowie dadurch bedingt, in ihrem biologischen Verhalten unterscheiden, so zum Beispiel in der Fähigkeit, Komplement zu fixieren oder sich an die Oberfläche von Lymphozyten mittels ihrer Fc-Region anzulagern. Die mit dem zunehmenden Grad an Spezialisierung notwendige ausgereifte Regulation ist in dem System der von Idiotypen abhängigen Antiidiotypen zu sehen, die untereinander in allen Stufen der Immunantwort in engstem Kontakt stehen (Zusammenfassung: ROITT, 1984; LITMAN, 1978; PLAYFAIR, 1982).

2.2 Humorale und zelluläre Immunität

Ein Wirbeltierorganismus reagiert auf zweierlei Arten, wenn fremdes Antigen seine Barrieren durchbrochen hat und in das Körperinnere eingedrungen ist. Spezialisierte Zellen nehmen das Antigen auf, verarbeiten es und stellen es anderen Zellen in der Weise zur Verfügung, daß diese entsprechende Informationen über die Antigenität des Materials erhalten und dann in der Lage sind, durch von ihnen produzierte Antikörper das Antigen zu neutralisieren und aus dem Körper zu entfernen. Die erstgenannten Zellen sind die Makrophagen und die Zellen, die spezifisch Antikörper produzieren, sind die Plasmazellen. Auf der ande-

ren Seite verfügt der Organismus über Zellen, die in der Lage sind, als fremd erkannte Zielzellen oder Körperzellen mit veränderter Oberflächenstruktur zu binden und abzutöten, wobei sowohl Zellen beteiligt sind, die vorher Antigenkontakt gehabt haben müssen, als auch solche, die ohne vorherigen Kontakt mit dem Antigen dieses zu bekämpfen vermögen.

Die Fähigkeit zur Abwehr ist in einem Organismus nicht von Anfang an vorhanden, sondern muß erst heranreifen. Für die einzelnen beteiligten Zellen konnten dabei spezielle Organe entdeckt werden, in denen die Lymphozyten, bevor sie immunologisch kompetent werden, heranreifen. Beim Huhn wurde durch Entfernung entweder des Thymus oder der Bursa Fabricii sowie Beseitigung bereits immunkompetenter Zellen durch Bestrahlung der Nachweis geführt, daß der Thymus für die Entwicklung der zellabhängigen Immunität und die Bursa für die Entwicklung der humoralen Immunität zuständig sind. Die Thymektomie führte zu einem Versagen der Reaktion auf fremde Transplantate sowie zum Ausbleiben der Tuberkulinreaktion. Die Bursektomie verhinderte die Antikörperbildung nach Injektion von Antigen (COOPER et al., 1966).

Die derart thymusabhängigen T-Zellen und die bursaabhängigen B-Zellen agieren aber nicht unabhängig voneinander. Einblicke in diese Wechselwirkungen lieferten Untersuchungen an mit Hapten-Träger-Konjugaten immunisierten Tieren. Für eine Sekundärantwort auf eine gegebene Hapten-Träger-Kombination war auch eine Immunisierung mit beiden Bestandteilen notwendig, ein Auswechseln des Trägers verursachte ein Ausbleiben der Sekundärantwort gegenüber dem Hapten; erst nach Immunisierung mit dem neuen Träger ist eine Sekundärantwort auf die neue Hapten-Träger-Kombination möglich (MITCHINSON et RAJEWSKY, 1970).

Die Immunantwort durch B-Zellen ist je nach Antigen von einer Kooperation mit T-Zellen abhängig; T-Zell-unabhängige Antigene führen vorzugsweise zur Produktion von IgM-

Antikörpern, während eine durch Vermittlung der T-Zellen zustande gekommene Proliferation zur Antikörperbildung vom IgG-Typ führt.

Die Abwehr intrazellulär parasitierender oder sich vermehrender Krankheitserreger erfolgt durch T-Zellen. Die Regulation der T- und B-Zellaktivität sowie ihr Zusammenwirken mit Makrophagen erfolgt unter anderem auch durch lösliche Mediatorsubstanzen, sogenannte Interleukine, und durch direkten Kontakt über Rezeptoren zu dem Antigen und den anderen beteiligten Zellen (Zusammenfassung ROITT, 1984).

Mediatorenfreisetzung ist überhaupt eine sehr wichtige Aufgabe der T-Zellen: sie bewirken eine Heranführung von Granulozyten und Monozyten sowie deren Fixation am Ort des Geschehens oder auch die Veränderung der Gefäßpermeabilität und erhöhen die Thrombozytenaggregationsfähigkeit.

Eine gemeinsame Eigenschaft von B- und T-Zellen ist die Fähigkeit, nach der Abwehr des betreffenden Antigens Gedächtniszellen zu bilden, die im Falle einer erneuten Auseinandersetzung mit dem gleichen Antigen zu einer schnelleren und stärkeren Antwort führen.

2.3 Lymphozytensubpopulationen und ihre Bedeutung

Alle immunkompetenten Zellen stammen von einer gemeinsamen pluripotenten Stammzelle ab, von der auch die anderen Zellen des Blutes abstammen.

Die Ontogenese findet zum Teil in der Leber und im Knochenmark statt. Für einen Teil der Zellen bleibt dann das Knochenmark der Ort der weiteren Reifung, beim Vogel ist das die Bursa Fabricii, der andere Teil der Zellen reift in einem speziellen epitheloiden Organ, dem Thymus heran. Deshalb ordnet man alle immunkompetenten Zellen, soweit

sie diese zentralen immunologischen Organe durchlaufen haben, als T- (Thymus)- oder B- (Bursa)-Zellen ein. Die T-Zellen lassen sich aufgrund von Unterschieden in Funktion und Oberflächenmarkern in vier Untergruppen aufteilen:

Cytotoxische T-Zellen, die durch Zellen mit unterschiedlichen MHC-Antigenen stimuliert werden und diese lysieren, weisen gewisse Ähnlichkeiten in ihren antigenen Determinanten mit T-Suppressorzellen auf. Ihre Stimulation und Tätigkeit in vitro belegt die Abhängigkeit von humoralen und zellulären Faktoren (WAGNER, 1978; WAGNER, 1980). Ihre Funktionen in vivo lassen sich natürlich nicht von denen anderer cytotoxischer Zellen abgrenzen.

Für die Stimulation ihrer Tätigkeit in vitro ist außer dem Vorhandensein von Antigen insbesondere die Interaktion mit T-Helferzellen und dem von ihnen freigesetzten Interleukin-2 erforderlich. Bei einer Stimulation von geprimten cytotoxischen Lymphozyten ist das Vorhandensein von Antigen nicht nötig, sondern kann ersetzt werden durch Zugabe von Interleukin-2 (WAGNER et RÖLLINGHOFF, 1978; McDONALD, 1980). Diese Ergebnisse betreffen vor allem die Maus.

Die T-Suppressorzellen sind regulative Zellen. Sie beeinflussen die Aktivität von B-Zellen gleichermaßen wie die von T-Zellen. Nach Behandlung mit Antilymphozytenserum stieg die Antwort auf T-Zell-unabhängige Antigene, wie zum Beispiel Pneumokokken-Polysaccharid, deutlich an (BAKER, 1970a).

Die Regulation der Suppressoraktivität ist von einer dreistufigen Antwort auf die Aktivierung hin geprägt. Suppressorzellen, die das Antigen erkennen, sowie Suppressorzellen, die den Antikörperidiotyp erkennen, wirken auf verschiedene Weise, hauptsächlich aber durch Freisetzung von antiidiotypisch wirkenden Suppressorfaktoren (GERMAIN et al., 1978). Eine Aktivierung von unspezifischen Suppressorzellen ist durch Behandlung mit Concanavalin A in vitro

und durch den Monoklonalen Antikörper gegen das Antigen Leu-4 des Menschen bekannt (DAMLE et al., 1985).

Die T-Helferzelle fördert im Gegensatz zur Suppressorzelle durch Interaktion mit B-Zellen die Antikörperproduktion, ebenso die Aktivierung der zytotoxischen Lymphozyten in der Mixed Lymphocyte Reaction. Für den Wirkungsmechanismus beider Populationen ist experimentell der gleiche Ablauf wie bei den Suppressorzellen gesichert (EICHMANN et RAJEWSKY, 1975; McNAMARA et al., 1985).

Die T-Helferzellen weisen zumindest in ihren frühen Stadien bei der Maus gleiche Determinanten wie die Effektorzellen der verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion auf, die für die Tuberkulinreaktion verantwortlich sind. Durch ihre Übertragung nach Sensibilisierung gelingt es, die Reaktion auch auf bis dahin nicht reaktive Individuen zu übertragen, soweit sie über funktionsfähige T-Zellpopulationen verfügen, was gleichzeitig die Abhängigkeit der Tuberkulinreaktion von T-Effektorzellen beweist (STRASSMANN et al., 1980).

Die B-Zellen produzieren nach Aktivierung als Plasmazellen die gegen das Antigen gerichteten Antikörper; je nach der chemischen Struktur des Antigens sind sie dabei von der Unterstützung durch T-Zellen abhängig, die mit ihnen über Ia-Antigene in Kontakt treten. Ohne Unterstützung durch T-Zellen bleibt die B-Zelle bei der Produktion von IgM, im anderen Falle vermag sie unter Beibehaltung des Idiotyps auch schwere Ketten der anderen Isotypen (Ig A und Ig G) zu synthetisieren (ROITT, 1984). Mittels Monoklonaler Antikörper konnte nachgewiesen werden, daß beim Menschen Vorläufer der Plasmazellen direkt von der Synthese von IgM auf IgA oder IgG umzuschalten vermögen, ohne zwischendurch die jeweils andere Klasse zu produzieren; des weiteren verlieren Plasmazellen durch die Aktivierung das vorher zusammen mit den anderen Isotypen an der Membran befindliche IgD, wie durch Aktivierung der Zellen

mit Pokeweed Mitogen gezeigt werden konnte (KURITANI et COOPER, 1982).

Für jede der obengenannten Subpopulationen werden nach erstmaligem Antigenkontakt Gedächtniszellen ausgebildet, die eine lange Lebensdauer aufweisen und nach Abklingen der Erstantwort dem Organismus für eine verbesserte Zweitantwort zur Verfügung stehen.

Eine Subpopulation besonderer Art stellen die Zellen aus der Null-Linie dar, die mit den ursprünglichen Bestimmungsmethoden weder den B-Zellen noch den T-Zellen zuzuordnen sind. Ihre Aufgabe ist vor allem die natürliche Killer (NK)-Zellaktivität, d.h. die Bekämpfung von fremden oder veränderten eigenen Zellen ohne vorherige Erfahrung mit dem auslösenden Antigen. Ihre heute nachweisbaren Oberflächenmarker zeigen sowohl Reaktionen mit Monoklonalen Antikörpern, die gegen T-Zellen gerichtet sind, als auch mit solchen Antikörpern, die gegen Zellen der myeloischen Reihe, speziell Makrophagen, gerichtet sind. Die NK-Zellen sind daher vielleicht einer eigenen Zell-Linie zuzuordnen (ORTALDO et al., 1981).

Die Basis für viele dieser Reaktionen liefern die Makrophagen, die nicht nur aktiv phagozytieren, sondern auch den B- und T-Lymphozyten die Antigene so präsentieren, daß eine entsprechende Kontaktaufnahme möglich wird. Je nach Lokalisation weisen die Makrophagen unterschiedliche Funktionen und damit auch eine abweichende Morphologie auf. Die Alveolarmakrophagen und die Kupffer'schen Sternzellen der Leber sind überwiegend für die Phagozytose zuständig, während die Langerhans-Zellen der Haut und die dendritischen Zellen in sekundären lymphatischen Organen mehr die Aufgabe haben, Antigen den immunkompetenten Zellen zu präsentieren (MILLER, 1980; PIERCE, 1976). An der Oberfläche von Makrophagen finden wir auch Rezeptoren für den Fc-Teil von IgG₁ und IgG₃ sowie für die dritte Komponente von Komplement, was sie zusammen mit den lysosomalen

Enzymen zu sehr effektiven Zellen macht. Weiterhin treten sie nicht nur über ihre Rezeptoren mit den Lymphozyten in Kontakt, sondern vermögen sie auch mittels löslicher Substanzen, dem Interleukin-1, zu stimulieren.

2.4 Oberflächenantigene von Lymphozytensubpopulationen

Alle kernhaltigen Zellen von Säugern tragen an ihrer Oberfläche Antigene, die sowohl für das jeweilige Individuum wie auch für eine bestimmte Spezies typisch sind. Lediglich eineiige Zwillinge oder syngene Tiere aus Inzuchtlinien weisen die gleichen Antigene auf. Dadurch daß das Individuum die eigenen Zellen aufgrund dieser Antigene erkennt und von eingedrungenen oder transplantierten Zellen unterscheidet, ist es in der Lage, seine Integrität zu wahren.

Durch Transplantationsversuche wurde man auf diese genetisch fixierten Unterschiede in der Oberflächenstruktur aufmerksam und nennt sie deshalb Transplantationsantigene. Seitdem man weiß, daß es sich dabei um mehrere verschiedene Antigene handelt, die auch in gegenseitigen Abhängigkeiten stehen, bezeichnet man diese Antigene als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), ebenso die dazugehörigen Gene, die räumlich eng assoziiert auf den Chromosomen liegen. Die Eigenschaften und Funktionen, die mit dem MHC verbunden sind, sind bei allen untersuchten Säugerspezies homolog. Die besten Informationen besitzt man über den MHC der Maus, wo er H-2 Komplex genannt wird (KLEIN et al., 1981).

Den H-2 Komplex kann man in vier Regionen, nämlich H-2 K, I, S und D unterteilen. Die K- und D-Region kodieren für die klassischen Transplantationsantigene oder Klasse I-Antigene, die serologisch definierbar sind und auf allen Zellen eines Individuums zu finden sind; die Klasse

I-Antigene dienen deshalb auch als Zielantigene für cytotoxische T-Zellen. Der D-Region benachbart liegt die S-Region, die für die Synthese und Kontrolle des Serumspiegels der vierten Komponente des Komplementsystems zuständig ist. Zwischen der S- und der K-Region finden wir die I-Region, die in fünf Subregionen unterteilt werden kann.

Die Genprodukte dieser H-2 I-Region werden als Klasse II oder Ia (Immune associated)-Antigene bezeichnet und sind zu finden auf Lymphozyten, Makrophagen und epidermalen Zellen; sie dienen vor allem immunregulativen Zwecken (SCHREFFLER et DAVID, 1975). Ebenso in der I-Region liegen die Ir (Immune response)-Gene, die die Immunreaktivität auf verschiedene natürliche und synthetische Antigene regulieren (BENACERRAF et GERMAIN, 1978).

Den Subregionen H-2 I-A, I-B, I-C, I-E und I-J kann man unterschiedliche Funktionen zuordnen.

Die Suppressor-T-Zellaktivität wird von der I-J und der I-C Subregion reguliert (BRONDZ et al., 1980). Die von diesen Subregionen abhängigen Antigene dienen auch als Differenzierungsantigene (GERMAIN et BENACERRAF, 1981).

Entsprechendes gilt für die Helfer-T-Zellaktivität und ihre Antigene, sie sind von der I-A und der I-E Subregion abhängig (LONAI et al., 1981; TOKUHISA et al., 1978). Unterschiede in der Exprimierung der I-A Subregion sind die Ursache für die Stimulation der T-Helferzellen in der Mixed Lymphocyte Reaction. Bedeutsam ist ferner, daß die auf regulativen T-Zellen identifizierbaren Ia-Antigene nicht auf B-Zellen exprimiert werden (RICH et DAVID, 1979).

Auch die regulativen Faktoren der T-Zellen tragen die Ia-Determinanten der Suppressor- bzw. der Helferzellen (MOZES et HAIMOVICH, 1979; LONAI et al., 1981; GERMAIN et BENACERRAF, 1981).

Das dem H-2 Komplex der Maus vergleichbare HLA-System des Menschen kodiert in den Loci A und B ebenfalls Klasse I

Antigene, die der H-2 K/D Region entsprechen, der C-Locus liefert Antigene mit schwächerer Reaktion. Die Klasse II-Antigene werden durch den HLA-D Locus, der mehrere Subloci besitzt, reguliert. In Homologie mit der H-2 I-E/A Subregion der Maus unterscheidet man beim Menschen die Subloci HLA-DR/DC, sowie funktionell getrennt HLA-SB (BRODSKY et al., 1979).

Auch beim Schwein hat man vergleichbare genetische Strukturen entdeckt und sie in Analogie als SLA-A, -B, -C sowie SLA-D bezeichnet. Die Loci SLA-A, -B kodieren Klasse I-Antigene, der Locus SLA-C Klasse II-Antigene; der Locus SLA-D codiert die Ia- und die Ir-Antigene (BUSCHMANN, 1984).

Die Genprodukte des MHC sind membranständige Glycoproteine mit mehreren Polypeptidketten; interessanterweise weist die α_3 -Domäne der H-2 K/D Peptide mit dem β_2 -Mikroglobulin, dem Thy-1-Antigen und Domänen der konstanten Regionen der Immunglobuline hohe Homologiegrade auf, die auf einen gemeinsamen evolutiven Ursprung hindeuten (BRODSKY et al., 1982).

Bei der Maus kennt man weitere Gene für Alloantigene, die eine Unterscheidung zwischen den verschiedenen funktionellen T-Zellpopulationen zulassen. Es sind dies die Ly(t)-Antigene:

Ly-1, -2, -3; man kennt die Allele $Ly\ 123^+$, $Ly1^+$ und $Ly23^+$. Unreife Zellen sind $Ly123^+$ und fungieren als Zielzellen für die $Ly23^+$ -Zellen, die die Suppressorfunktion ausüben. Ebenfalls $Ly23^+$ sind die cytotoxischen Lymphozyten. Die T-Helferzellen sowie die Effektorzellen der verzögerten Hypersensitivität sind dagegen $Ly1^+$ (BOYSE, 1968, 1971; KLEIN 1975). Weiterhin kennt man das Thy-1 Antigen (früher Theta), das auf allen T-Zellen exprimiert wird.

Für den Menschen sind diese funktionellen Subpopulationen inzwischen auch durch verschiedene Monoklonale Antikörper definiert: OKT-3 und Leu-1 für alle T-Lymphozyten, OKT-4 und Leu-3 markieren Helferzellen und OKT-5/OKT-8 und

Leu-2a/b markieren Suppressorzellen (REINHERZ et SCHLOSS-MANN, 1980; EVANS et al., 1981).

Verschiedene Subpopulationen von Schweinelymphozyten wurden bisher ansatzweise auch mit Monoklonalen Antikörpern untersucht. Die dem $Ly23^+$ bzw. $Leu-2a/T8^+$ der Maus und des Menschen entsprechenden Antigene werden durch die Monoklonalen Antikörper 295/33 und 122/26 sowie durch 76-2-11 markiert, wie durch Immunpräzipitation und funktionelle Tests nachgewiesen wurde, jedoch sind die Angaben teilweise unvollständig. Die für die Identifizierung der Helferzellsubpopulation untersuchten Monoklonalen Antikörper weisen funktionelle Homologie auf, zeigen aber als Immunpräzipitate nicht volle Übereinstimmung mit den entsprechenden Antigenen bei Mensch und Maus (JONJIC et KOSZINOWSKI, 1984; PESCOVITZ et al., 1984).

Weitere Untersuchungen mit diesen Monoklonalen Antikörpern sowie Produktion von weiteren Monoklonalen Antikörpern zur umfassenden Bestimmung aller strukturellen und funktionellen Eigenschaften der immunkompetenten Zellen vom Schwein sind daher angezeigt.

2.5 Untersuchungsverfahren zur Lymphozytenfunktions- bestimmung

Die Bestimmung von immunkompetenten Zellen bedarf einer Reihe von unterschiedlichen Untersuchungsmethoden, da viele Zellen, die unterschiedlichen Subpopulationen angehören, oft gemeinsame morphologische und physiologische Eigenschaften aufweisen oder aber identische Zellen in unterschiedlichen Reifestadien auftreten. Allein die morphologische Betrachtung führt auch bei Verwendung des Elektronenmikroskops nur zu begrenzten Aussagen. Deshalb hat man eine umfangreiche Palette von Methoden entwickelt, mit denen das Verhalten und die Funktion der immunkompe-

tenten Zellen untersucht werden können. Durch Kombination der verschiedenen Verfahren gelangt man zu Aussagen über einzelne Subpopulationen und ihre Bedeutung.

Vorteilhafterweise führt man solche Untersuchungen nicht an vollständigen Blut- oder Gewebeproben aus, sondern trennt die Zellen mit Hilfe bestimmter Methoden auf. Mittels Zentrifugation im Dichtegradienten gelangt man zu einer Population von mononukleären Zellen (BÖYUM, 1968), aus der durch weitere Zentrifugation in einem diskontinuierlichen Gradienten z.B. große granulierten Lymphozyten isoliert werden können (TIMONEN et SAKSELA, 1980).

Eine große Gruppe weiterer Trennmethode basiert auf den verschiedenen Rosettentechniken: Eine größere Population der peripheren Lymphozyten bildet spontan mit Schäferythrozyten Rosetten (ESCAJADILLO et BINNS, 1975a, b), die anschließend durch Zentrifugation von den nicht rosettierten Zellen getrennt werden können. B-Zellen können durch ihren Komplement- und Antigenrezeptor zur Rosettierung mit Antigen und Komplement vorbehandelten Erythrozyten veranlaßt werden. Auch Fc-Rezeptoren können zur Rosettenbildung und anschließender Auftrennung durch Zentrifugation herangezogen werden, wenn geeignete Antiseren zur Verfügung stehen (BINNS, 1983).

B-Zellen isoliert man sehr einfach durch Adhärenz an mit anti-Immunglobulin beschichteten Plastikschalen (WYSOCKI et SATO, 1978; CWIK et al., 1981), oder Adhärenz an Nylonwolle (JULIUS et al., 1973; BUSCHMANN et PAWLAS, 1980).

Da die Zellmembranen der Lymphozyten Antigendeterminanten besitzen, lassen sich durch Immunisierung anderer Tiere mit diesen Alloantigenen entsprechende polyklonale Antiseren erzeugen, die dann wieder zur Charakterisierung der Lymphozytenpopulationen zur Verfügung stehen. Auf diese Weise konnten z.B. die Allele des Thy-1 Antigens durch REIF und ALLEN (1964) entdeckt werden. Mit FITC-markierten anti-Ig-Seren läßt sich das Oberflächen-Ig der B-Zel-

len nachweisen (BUSCHMANN et PAWLAS, 1980).

Protein A von *Staphylococcus aureus* bindet ebenfalls an die B-Zellen (BAXI, 1980).

Seren, die sich gegen Antigene des MHC-Komplex richten, dienen zur Gewebetypisierung und genauer Untersuchung des MHC-Komplex (LUNNEY et SACHS, 1978, 1979).

Viele Erfolge wurden durch den Einsatz Monoklonaler Antikörper zur Bestimmung von verschiedenen Lymphozytensubpopulationen und deren Funktionen erzielt; der Definition einer Spezifität mußte die Untersuchung mit Zellanreicherungen nach bisherigen Verfahren vorausgehen. Die Helfer-T- und die Suppressor-T-Zellen beim Menschen sind z.B. sowohl durch je einen getrennten Monoklonalen Antikörper als auch durch einen gemeinsamen MAK definiert (REINHHERZ et al., 1979, 1980).

Monoklonale Antikörper können, unabhängig von dem Zusammenwirken mit Komplement, spezielle Effekte auf die von ihnen markierten Zellen ausüben, indem sie bestimmte Lymphozytenfunktionen hemmen (VAICKUS et LEVY, 1985; DAMLE, 1985).

Die Untersuchung der durch MAK markierten Zellen erfolgt vorzugsweise durch Immunfluoreszenz und Durchflußcytofluorometrie; sie ermöglicht die Bestimmung der Zellgröße und -dichte sowie die Bestimmung des Anteils fluoreszierender Zellen in bestimmten Subpopulationen. In entsprechenden Apparaten können die Zellen auch mittels ihrer Fluoreszenz sortiert und wiedergewonnen werden (LOKEN et HERZENBERG, 1975).

Auch die Abtrennung von MAK markierten Zellen mittels der Panning Technik ist möglich (ORTALDO et al., 1981; KURITANI et COOPER, 1982).

In funktionellen Untersuchungen werden die Interaktionen zwischen den beteiligten immunkompetenten Zellen untersucht. Die ursprünglich zur Bestimmung der Gewebeverträglichkeit eingesetzte Mixed Lymphocyte Culture liefert viele Ergebnisse über die beteiligten Zellen, ihre Akti-

vierung sowie über beteiligte Mediatorsubstanzen (BRADLEY, 1973). Die Übertragung von bereits kultivierten, sensibilisierten Zellen auf neue Kulturansätze oder die Übertragung von diesen Kulturüberständen auf neue Kulturen ermöglicht interessante Untersuchungen; Monoklonale Antikörper können bei der Bestimmung der beteiligten Populationen eine Rolle spielen (DAMLE, 1985).

Die Oberflächenmarker der Zellen sind biochemisch nicht nur Glycoproteine, sondern auch Polysaccharide; Lectine die mit diesen Sacchariden binden, wurden ursprünglich nur als blutgruppenspezifische Agglutinine bezeichnet. Eine Vielfalt von Pflanzenlektinen, die alle an Zellen binden, sind inzwischen bekannt, bedürfen aber zur Bestimmung ihrer Rezeptoren weitergehender Untersuchungen. So läßt sich bisher aussagen, daß PHA und Con A T-Zellen stimulieren. PWM stimuliert T- und B-Zellen und LPS nur B-Zellen (BUSCHMANN et PAWLAS, 1980b; SYMONS et CLARKSON, 1979b). Andere Untersuchungen zeigen eine Stimulation von T-Helferzellen durch PHA, während Con A für die T-Suppressorzellen zuständig ist (DAMLE, 1985). Peanut Agglutinin bindet bei Maus und Mensch an unreife Thymozyten und erlaubt so die Abtrennung dieser Zellen (SHARON, 1983).

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Verzeichnis der regelmäßig verwendeten Materialien

Antibiotika, als Zusätze zu den Kulturmedien:

Amphotericin B (5 mg/l, Squibb, von Heyden, München)

Bykomycin (100 mg/l, Byk Gulden, Konstanz)

Penicillin G (100.000 IU/l, Hoechst AG, Frankfurt)

Streptothetat (125 mg/l, Grünenthal, Stolberg)

als Kombination verwendet und als Standardzusätze bezeichnet;

Antikoagulantien:

Alsever Lösung:

2,05 g Dextrose, 0,8 g Natriumzitrat, 0,055 g Zitronensäure, 0,42 g NaCl (Merck, Darmstadt), ad 100 ml Aqua dest.

Heparin-Natriumsalz:

2.500 IU/100 ml Blut (Roth KG, Karlsruhe)

¹⁴C-Thymidin (Amersham, Fa. K. Weissner, München)

Ficoll-Trennlösung (Biochrom, Berlin)

Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

FMS, das gepoolte Serum der immunisierten, zur Fusion verwendeten Mäuse

Kaninchen Komplement (Behringwerke AG, Marburg)

Lysing Reagenz: 8,26 g NH₄Cl, 1,09 g NaHCO₃, 0,037 g Na-EDTA, ad 1000 ml Aqua dest.

Medien und Puffer:

CF-Medium:

Medium für die Untersuchung von Zellen im Cytofluorographen;

PBS ohne Ca/Mg mit 2% FKS, 1 % BSA, 0,2 % Natriumazid

Coating-Puffer, für die Beschichtung von ELISA-Platten:

1,59 Na₂CO₃, 2,93 g NaHCO₃, ad 1000 ml Aqua dest.

BSA, Bovines Serumalbumin (Behringwerke AG, Marburg)

MEM, Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen (Biochrom, Berlin)

NaCl-P-P., 38,25 g NaCl ad 4500 ml Aqua dest. und 900 ml
(10,52 g Na_2HPO_4 , 0,98 g KH_2PO_4 ad 1000 ml Aqua dest.)

PBS, phosphatgepufferte, physiologische Kochsalzlösung:

8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$, 0,2 g
 KH_2PO_4 , 0,1 g CaCl_2 , 0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ ad 1000 ml
Aqua dest.

PBS ohne Ca/Mg; 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 , 2,14 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ad 1000 ml Aqua dest.

RPMI: RPMI 1640 (Biochrom, Berlin)

TC 199: Medium 199 (DIFCO Lab., Detroit, USA)

FKS: Fötale Kälberserum, hitzeinaktiviert (Biochrom,
Berlin)

Natriumbikarbonat: (8,8 %ig) zum Puffern der Medien

Natriumazid, NaN_3 (Merck, Darmstadt)

MAK: Monoklonale Antikörper, stets als Zellkulturüber-
stände

Mitogene:

PWM: Pokeweed Mitogen aus *Phytolacca americana* (Bio-
chrom Berlin)

LPS: Lipopolysaccharid-W, bakteriell (DIFCO Lab.,
Detroit, USA)

PHA: Phytohämagglutinin aus *Phaseolus* spp. (Wellcome
Ltd., Dartford, England)

Con A: Concanavalin A (Sigma, Deisenhofen)

PBL: periphere Blutlymphozyten

Zellkulturgefäße: (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, USA)

Zellkulturröhrchen: (Nuncclon, Dänemark)

3.2 Isolierung von Zellen

3.2.1 Gewinnung von Schweinelymphozyten

Heparinisiertes Blut von gesunden, frischgeschlachteten Schweinen, als Einzel- oder Mischprobe, wurde 1 : 2 mit PBS verdünnt und 30 ml davon vorsichtig auf die gleiche Menge Ficoll-Trennlösung in Glaszentrifugenröhrchen (80 ml) geschichtet.

Die Proben wurden 30 min bei 400 x g zentrifugiert und die Interphase, nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes, mit der Pipette gewonnen.

Die Lymphozyten wurden einmal in Plastikzentrifugenröhrchen (50 ml) mit PBS gewaschen (10 min bei 600 x g). Nach dem Abgießen des Überstandes wurden die verbliebenen Erythrozyten des Lymphozytenpellets mit 5-10 ml Lysing-Reagenz 5 min lysiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen (10 min bei 600 x g).

Der Überstand wurde abgegossen und das Lymphozytensediment in RPMI, MEM oder PBS aufgenommen.

Die Zellzahl sowie der Anteil lebender Zellen wurden durch Zählung mit Trypanblau (0,16 % in physiol. Kochsalzlösung) in der Zählkammer bestimmt und die Konzentration auf $0,5-5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

3.2.2 Isolierung von Leukozyten

Durch Venenpunktion oder bei der Schlachtung gewonnenes, heparinisiertes Blut gesunder Tiere wurde 1 : 2 mit PBS verdünnt und 15 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Erythrozyten des Sediments mit 10-15 ml kaltem Lysing-Reagenz 10 min lysiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen (10 min bei 600 x g). Lysieren und Waschen wurden so oft durchgeführt, bis alle

Erythrozyten entfernt waren. Danach wurden die Zellen in PBS oder CF-Medium resuspendiert, die Zellzahl und der Anteil lebender Zellen bestimmt und abschließend die Konzentration auf $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

3.2.3 Isolierung von Zellen aus Thymus und Milz

Zur Untersuchung von Zellen aus dem Thymus und der Milz wurden Organe von frischgeschlachteten, gesunden Schweinen verwendet.

Die Bindegewebskapsel wurde mit der Schere entfernt und mehrere kleine Organteile (1 cm $\emptyset$), unter Spülung mit PBS, durch ein feinmaschiges Metallsieb gerieben. Die so erhaltene Suspension wurde unter weiterer Spülung mit PBS durch eine sechsfache Lage Gaze filtriert. Die Milzzellsuspension wurde durch Zentrifugation im Dichtegradienten (siehe 3.2.1) und Gewinnung der Interphase aufgetrennt und dann in PBS oder CF-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Die Thymuszellen wurden zweimal mit PBS gewaschen (10 min bei $600 \times g$) und in PBS oder CF-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.2.4 Gewinnung von Thrombozyten

Heparinisiertes Blut frischgeschlachteter, gesunder Schweine wurde unverdünnt in Plastikgefäßen 10 min bei $200 \times g$ und 4°C zentrifugiert und der Überstand durch Absaugen gewonnen.

Der Überstand wurde dann 30 min mit $1600 \times g$ bei 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Thrombozytensediment dreimal mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen (10 min mit $1600 \times g$, bei 4°C). Die Thrombozyten

wurden in CF-Medium aufgenommen und nach Zählung in der Zählkammer auf 1×10^6 Thrombozyten/ml eingestellt.

3.2.5 Gewinnung von Erythrozyten

Erythrozyten wurden aus dem Sediment der bei der Gewinnung von Lymphozyten mit der Ficollmethode verwendeten Blutprobe gewonnen. Die Erythrozyten wurden zweimal mit PBS gewaschen (10 min bei 600 x g) und dann auf 1×10^6 Zellen/ml in CF-Medium eingestellt.

3.3 Produktion Monoklonaler Antikörper

3.3.1 Erzeugung von Hybridomzellen

BALB/c-Mäuse wurden mit Schweinelymphozyten, gewonnen durch Zentrifugation im Dichtegradienten (s. 3.2.1), mehrfach immunisiert.

Drei bis vier Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Mäuse in Äthernarkose getötet und ihnen die Milzen entnommen, sowie Blut aus der Vena hepatica gewonnen; Das Blutserum mehrerer Mäuse wurde gepoolt und in allen Versuchen als Positivkontrolle eingesetzt: Fusionsmauserum (als FMS bezeichnet).

Aus den Milzen wurde durch Verreiben eine Einzelzellsuspension hergestellt (s. 3.2.3); die so gewonnenen Milzzellen wurden mit Myelomzellen der Linie X63 - Ag8.653 in Anwesenheit von Polyäthylenglykol (PEG) fusioniert und anschließend im HAT-Selektivmedium kultiviert. Nachdem die Kulturen sich stabilisiert hatten, wurden sie kloniert.

Nach der Klonierung wurden die Zellkulturüberstände auf ihren Gehalt an Antikörpern gegen Schweinelymphozyten

untersucht.

Im positiven Falle wurden die Überstände gewonnen und die Hybridomzellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.3.2 Nachweis von MAK gegen Schweinelymphozyten

Als Suchtest zum Auffinden von Monoklonalen Antikörpern gegen Schweinelymphozyten (Screening) diente ein ELISA. Mikrotiterplatten (M 129A, Dynatech, Ploching) wurden mit je 100 μl /Vertiefung Poly-L-Lysin (1 : 50 in PBS verdünnt, Sigma, Deisenhofen) beschichtet und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, gut ausgeschlagen und mit je 100 μl /Vertiefung Schweinelymphozyten ($5 \times 10^6/\text{ml}$) beschickt. Die Platten wurden anschließend bei 400 x g 5 min zentrifugiert.

Pro Vertiefung wurden 100 μl 0,5 % Glutaraldehyd (25 %iges 1 : 50 in kaltem PBS kurz vor Gebrauch verdünnt, Merck, Darmstadt) zugefügt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Pro Vertiefung wurden 100 μl 1 %iges BSA mit 100 mM Glycin (Merck, Darmstadt) in physiol. Kochsalzlösung zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. (Die Platten konnten bei -20°C aufbewahrt werden.) Zum Test wurden je 100 μl Zellkulturüberstände bzw. das Serum der immunisierten Mäuse (Fusionsmausserum, FMS, 1 : 20 in physiol. Kochsalzlösung verdünnt) als Positiv- und Kulturmedium als Negativkontrolle, in Doppelansätzen, in die Vertiefungen der mit PBS gewaschenen Platten pipettiert.

Die Platten wurden abgedeckt, kurz geschüttelt und 1 h bei 37°C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit NaCl-P-P (mit 0,05 % Tween 20) erfolgte der Zusatz von je 100 μl des Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpers (GAM/Ig/PO, Nordic, Bochum,

1 : 3000 verdünnt in NaCl-P-P mit 5 % FKS). Die Platten wurden abgedeckt, geschüttelt und 45 min bei 37°C inkubiert, dann dreimal mit NaCl-P-P (mit 0,05 % Tween 20) gewaschen.

Zur Sichtbarmachung der Reaktion wurden je 100 µl folgenden Substrates dazugegeben: 30 %iges H_2O_2 , Merck, Darmstadt, 1 : 10000 verdünnt mit einer Indikatorlösung aus 0,05 %igem ortho-Phenyldiamin in einem Puffer mit 1,2 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,19 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 0,37 g Na-EDTA pro Liter Aqua dest. Unter Schütteln wurden die Platten 20-30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion in einem 8-Kanal-Photometer (Dynatech, Plochingen) bei 450 nm gemessen. Als positiv galten Extinktionswerte von 0,1 oder größer. Solche Kulturen wurden weiteruntersucht und ihr Antikörpertiter bestimmt, die anderen wurden verworfen.

3.3.3 Bestimmung der Ig-Klassen bzw. -Subklassen

Mikrotiterplatten (M 129A, Dynatech, Plochingen) wurden mit je 100 µl/Vertiefung Antiseren als Antigen beschichtet: (Ziege-anti-Maus (GAM) IgM 4 µg/ml, GAM IgG 4 µg/ml, GAM/IgG₁ 7 µg/ml, GAM/IgG_{2a} 8 µg/ml, GAM/IgG_{2b} 7 µg/ml, GAM/IgG₃ 8 µg/ml und GAM/IgA 6 µg/ml, Nordic, Bochum) in Coating Puffer, pH 9,6; Die Platten wurden mit Folie abgedeckt 3 h bei 37°C und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zum Test wurden die Platten dreimal mit NaCl-P-P (mit 0,05 % Tween 20) gewaschen und anschließend je 100 µl 1 %iges BSA in NaCl-P-P (mit 0,05 % Tween 20) hinzugefügt, mit Folie abgedeckt, kurz geschüttelt und 1 h bei 37°C inkubiert. Mit NaCl-P-P (mit 0,05 % Tween 20) wurde dreimal gewaschen und dann je 100 µl Zellkulturüberstände bzw. Fusionsmausserum als Positiv- und Medium als Negativkontrolle, in Doppelansätzen, in die Vertiefungen

pipettiert.

Die weitere Durchführung erfolgte wie unter Kapitel 3.3.2 beschrieben wird.

3.4 Auftrennung von Lymphozytensuspensionen

3.4.1 Trennung über Nylonwolle-Säulen

Je 1 g Nylonwolle (Leukopak, Fenwal Lab., Deerfield, Ill. USA) wurde eine Woche bei 37°C in Aqua dest. gewaschen, anschließend bei 37°C getrocknet, locker in 20 ml Spritzen gepackt, mit Alufolie verschlossen und autoklaviert.

Zur Vorbereitung der Trennung wurden die Säulen mit 20 ml PBS gefüllt, dicht verschlossen und 1 h bei 37°C inkubiert.

Ficollierte Lymphozyten vom Schwein wurden auf 3×10^7 Zellen/ml in PBS (mit 5 % FKS) eingestellt und 2 ml der Zellsuspension auf die Säule gegeben, mit 2 ml PBS (mit 5 % FKS) wurden die Zellen eingespült, die Spritze dicht verschlossen und bei 37°C für 45 min inkubiert. Die nicht-adhärenenten Zellen konnten durch Zugabe von 25 ml PBS (mit 5 % FKS) gewonnen werden; sie wurden anschließend zentrifugiert (10 min bei 600 x g), im CF-Medium aufgenommen, gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Mit weiteren 25 ml PBS (mit 5 % FKS) konnten Zellen gewonnen werden, die sich genauso wie das erste Eluat verhielten.

Zur Loslösung der adhärenenten Zellen wurde die Säule mit folgendem 37°C-warmen Puffer gewaschen: 8,0 g Kochsalz, 0,2 g Na-EDTA, 0,2 g KCL, 0,2 g Na_2HPO_4 und 0,2 g Glukose auf einen Liter Aqua dest.

Diese Zellen wurden einmal mit PBS (mit 5 % FKS) gewaschen

(10 min bei 600 x g) und in CF-Medium aufgenommen; nach Zellzählung wurden sie auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Nylonwolle konnte nach Waschen mit 1 %iger Salzsäure wiederverwendet werden.

3.4.2 Trennung von Lymphozyten durch Panning

3.4.2.1 Abtrennung der Lymphozyten mit membrangebundenem Immunglobulin

Dazu wurden Plastikpetrischalen (85 mm Ø) mit Kaninchen-Immunglobulin folgender Spezifität und Konzentration beschichtet: Kaninchen Ig 0,045 mg und Kaninchen-anti-Schweine-IgG 0,015 mg (Nordic, Bochum) in 10 ml PBS; Die Petrischalen wurden 40 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend viermal mit PBS gewaschen.

1×10^7 ficollierte Lymphozyten wurden in 5 ml PBS (mit 5 % FKS) auf die beschichteten Schalen gegeben. Sie wurden dann 40 min bei 4°C inkubiert, die Schalen leicht geschwenkt und weitere 30 min bei 4°C inkubiert.

Der Überstand mit den nichtadhärenten Zellen wurde gesammelt und durch fünfmaliges, vorsichtiges Spülen mit PBS (mit 5 % FKS) alle nichtadhärenten Zellen gewonnen. Diese Zellen wurden zentrifugiert (10 min bei 600 x g) und in CF-Medium aufgenommen; nach Zählung wurden sie auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Die adhärenenten Zellen wurden durch wiederholtes, vorsichtiges Reiben mit einem kurzen Stück Silikonschlauch und Spülen mit PBS (mit 5 % FKS) von der Petrischale gelöst, gesammelt, zentrifugiert (10 min bei 600 x g) und in CF-Medium aufgenommen; sie wurden nach Zählung auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.4.2.2 Abtrennung von Lymphozyten mit Fc-Rezeptoren

Die Plastikpetrischalen wurden mit folgenden Seren beschichtet:

- Ein Ansatz mit Kaninchen-anti-Schweineerythrozyten Serum IgM-Fraktion, 1 : 10 in PBS verdünnt;
- Ein Ansatz mit Kaninchen-anti-Schweineerythrozyten Serum IgG-Fraktion, 1 : 100 in PBS verdünnt;

(die Seren waren durch Immunisierung von Kaninchen erzeugt worden).

Der weitere Ablauf erfolgte wie in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben.

3.4.3 Trennung durch E-Rosettensedimentation

Schafblut, 1 : 2 in Alsever Solution, wurde dreimal mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen (10 min bei 600 x g) und die Erythrozyten als 2 %ige Suspension in einer 17 %igen Ficoll 400-Lösung mit 84 IU/ml Heparin-Natrium aufgenommen.

Ficollierte Lymphozyten wurden zweimal mit Medium 199 gewaschen (10 min bei 600 x g) und in Medium 199 auf 5×10^6 Zellen/ml eingestellt.

1,5 Volumenteile der Erythrozytensuspension wurden mit 1 Volumenteil der Lymphozytensuspension gemischt, 15 min bei 37°C inkubiert und 5 min bei 200 x g und 4°C zentrifugiert; darauf folgte eine Inkubation für 1 h auf Eis.

Die Mischung wurde durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert, 30 ml vorsichtig auf das gleiche Volumen kalter Ficoll-Trennlösung gelagert (80 ml Glaszentrifugenröhrchen) und bei 4°C 30 min mit 400 x g zentrifugiert.

Die Interphase wurde durch Absaugen gewonnen, zweimal ge-

waschen mit PBS (mit 5 % FKS) und die nichtrosettierten Lymphozyten in CF-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Aus dem Sediment mit den E-Rosetten wurden die Lymphozyten durch Lysieren der Erythrozyten mit Lysing-Reagenz gewonnen, zweimal mit PBS (mit 5 % FKS) gewaschen und auf 1×10^6 Zellen/ml in CF-Medium eingestellt.

3.4.4 Abtrennung von Makrophagen

Ficollierte Lymphozyten wurden auf 2×10^6 Zellen/ml in PBS (mit 5 % FKS) eingestellt und 5 ml der Suspension auf Plastikpetrischalen (85 mm Ø) gegeben und bei 37°C für 1 h inkubiert. Dann wurden die nichtadhärenten Zellen abgegossen, gesammelt und noch viermal mit PBS (mit 5 % FKS) vorsichtig gespült.

Die adhärenen Zellen wurden durch vorsichtiges Reiben mit einem kurzen Stück Silikonschlauch und Spülen mit PBS (mit 5 % FKS) gewonnen.

Die beiden so gewonnenen Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (10 min bei 600 x g) und in CF-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

3.5 Nachweis von komplementabhängiger Zytotoxizität der Monoklonalen Antikörper

Ficollierte Schweinelymphozyten wurden auf 1×10^6 Zellen/ml in CF-Medium eingestellt und je 100 µl der Zellen mit 100 µl der Zellkulturüberstände bzw. Fusionsmausserum als Positiv- und Medium als Negativkontrolle versetzt und 30 min bei Raumtemperatur, unter gelegentlichem Schütteln, inkubiert.

Zu jedem Ansatz erfolgte die Zugabe von 100 µl Kaninchen-Komplement (1 : 20 verdünnt in physiol. Kochsalzlösung) und dann wurde 1 h bei 37°C inkubiert.

Nach einmaliger Waschung mit PBS ohne Ca/Mg (10 min bei 600 x g) wurden die Zellkerne der abgetöteten Zellen mit 50 µl Ethidiumbromid (4 µg/ml in physiol. Kochsalzlösung, Sigma, Deisenhofen) während einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur gefärbt.

Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS ohne Ca/Mg (10 min bei 400 x g) in 1 ml PBS ohne Ca/Mg aufgenommen.

Die Bestimmung des Prozentsatzes der rotfluoreszierenden, toten Zellen erfolgte im Cytofluorographen.

Die spezifische Zytotoxizität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Zytotoxizität} = \frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{MAK}} - \text{Fluoreszenz}_{\text{Kontrolle}}}{\text{Fluoreszenz}_{\text{FMS}} - \text{Fluoreszenz}_{\text{Kontrolle}}} \times 100$$

3.6 Differenzierung der Monoklonalen Antikörper mittels Cytofluorographie

Die jeweiligen Zellpräparationen wurden auf 1×10^6 Zellen/ml in CF-Medium eingestellt. 200 µl der Zellsuspension wurden mit 100 µl Zellkulturüberstand bzw. Fusionsmausserum als Positiv- und Medium als Negativkontrolle 30 min auf Eis, unter gelegentlichem Schütteln, inkubiert.

Die Ansätze wurden dann mit je 2 ml PBS ohne Ca/Mg zweimal gewaschen (10 min bei 450 x g und 4°C). Mit je 100 µl eines FITC-konjugierten Sekundärantikörpers (GAM/mIg/FITC von Nordic, Bochum, 1 : 20 verdünnt in CF-Medium) wurden gebundene MAK markiert; die Inkubation erfolgte

für 30 min auf Eis, unter gelegentlichem Schütteln. Eine Kontrollprobe wurde nur mit CF-Medium inkubiert zum Nachweis der unspezifischen Fluoreszenz.

Die Proben wurden zweimal mit je 2 ml PBS ohne Ca/Mg gewaschen (10 min mit 450 x g, bei 4°C) und dann in je 1 ml PBS ohne Ca/Mg aufgenommen.

Die Auswertung erfolgte im Cytofluorographen (Spectrum III, Ortho-Diagnostics, Dr. Molter, Neckargemünd), wobei die Zellen nach Größe und Dichte im Laserstrahl vermessen wurden; mittels eines einstellbaren Ausschnitts (Trigger Region) konnten einzelne Subpopulationen untersucht werden und in ihnen der Anteil grünfluoreszierender Zellen bestimmt werden.

Aus mehreren Versuchsansätzen wurde der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet:

n = Anzahl der Versuchsansätze

$\bar{x}$ = Mittel des Prozentsatzes grünfluoreszierender Zellen

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

3.7 Einfluß der MAK auf Lymphozytenfunktionen

in vitro

3.7.1 Beeinflussung der mitogenen Stimulierbarkeit

Ficollisierte Lymphozyten aus Einzelproben wurden auf 2×10^6 Zellen/ml in PBS (mit 5 % FKS) eingestellt und die Zellen mit den Zellkulturüberständen bzw. dem Fusionsmausserum als Positiv- und Medium als Negativkontrolle im Verhältnis 2 : 1 gemischt. Bei Raumtemperatur wurde 30 min,

unter gelegentlichem Schütteln, inkubiert; dann wurde 1 Volumenteil Kaninchen-Komplement (1 : 20 verdünnt in physiol. Kochsalzlösung) zugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert.

Die Ansätze wurden anschließend zweimal mit PBS (mit 5 % FKS) gewaschen (10 min bei 450 x g) und in RPMI (mit Standardzusätzen und 10 % FKS) auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Je 100 µl der Zellen wurden, in Dreifachansätzen für jedes Mitogen, auf Mikrotiterplatten mit U-Boden verteilt. Dann wurden zu den Ansätzen je 100 µl folgender Mitogenverdünungen pipettiert:

PWM	25 µg/ml
PHA	20 µg/ml
LPS	2 mg/ml
Con A	25 µg/ml,

jeweils in RPMI (mit Standardzusätzen ohne FKS); Als Kontrolle dienten vorbehandelte Lymphozyten, denen nur Medium ohne Mitogene zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte, mit Folie abgedeckt, im Brutschrank bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ für 72 h. 24 h vor Kulturende wurden zu jedem Ansatz 25 µl ¹⁴C-Thymidin (1 µCi/ml in RPMI mit Standardzusätzen ohne FKS) pipettiert. Am Kulturende wurden die Platten bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellen zu zerstören.

Die Ansätze wurden mit einem Erntegerät (Automash, Dynatech-Plochingen) auf Glasfaserfiltern gesammelt, die Filterscheiben getrocknet und in Zählfläschchen (5 ml) gegeben.

Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint I, Zinsser, Frankfurt wurden die Proben im Szintillationszähler (Isocap 300, Nuncleon, Chikago, USA) gemessen. Die Ergebnisse als counts per minute (cpm) wurden wie folgt ausgewertet:

Mittelwert der cpm: $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$

Standardabweichung: $SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$

n: Anzahl der Einzelergebnisse

Die spezifische Hemmung der mitogenen Stimulation wurde nach folgendem Schema errechnet (auch für eine zusätzliche Stimulation zutreffend):

$$\text{Hemmung/} \begin{matrix} \text{Stimulation} \end{matrix} \text{ (in \%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{Mitogen/MAK cpm} - \text{Medium/MAK cpm}}{\text{Mitogen/Med.cpm} - \text{Medium/Med.cpm}} \right) \right] \times 100$$

3.7.2 Beeinflussung der Mixed Lymphocyte Reaction

Für diesen Versuch wurden ficollierte Lymphozyten, von zwei verschiedenen Individuen, benötigt. Die Lymphozyten von Tier A (Effektorzellen) wurden durch die mit Mitomycin C behandelten Zellen des Tieres B' (Stimulatorzellen) zur Proliferation angeregt; zur Kontrolle wurden Lymphozyten von Tier A ebenfalls mit Mitomycin C behandelt (A') und mit den unbehandelten Zellen inkubiert.

Ficollierte Lymphozyten von Schwein A wurden auf 2×10^6 Zellen/ml in PBS (mit 5 % FKS) eingestellt und mit Zellkulturüberständen bzw. Fusionsmausserum als Positiv- und Medium als Negativkontrolle im Verhältnis 2 : 1 gemischt. Die Inkubation erfolgte in Zellkulturröhrchen für 30 min bei Raumtemperatur; nach Zugabe eines Teils Kaninchen-Komplement (1 : 20 in physiol. Kochsalzlösung verdünnt) wurde bei 37°C 1 h im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurden die Proben mit PBS (mit 5 % FKS) zweimal gewaschen (10 min bei 450 x g) und in RPMI (mit Stan-

dardzusätzen mit 10 % FKS) auf $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt.

Die als Stimulatorzellen vorgesehenen Lymphozyten (A' und B' getrennt) wurden auf 8×10^6 Zellen/ml in PBS (mit 5 % FKS) eingestellt und mit je 40 μ l/ml Mitomycin C (0,5 mg/ml PBS, Sigma, Deisenhofen) 20 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert, anschließend wurden sie dreimal mit PBS (mit 5 % FKS) gewaschen (10 min bei 450 x g) und auf 3×10^6 Zellen/ml in RPMI (mit Standardzusätzen und 10 % FKS) eingestellt.

Für den Test wurden 100 μ l der Effektorzellen A mit je 100 μ l der Stimulatorzellen B' bzw. A' als Dreifachansätze in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit U-Boden gemischt (A - B' = Test, A - A' = Kontrolle).

Die Platten wurden mit Folie abgedeckt, bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ sechs Tage inkubiert. 24 h vor Kulturende erfolgte die Markierung mit je 25 μ l ¹⁴C-Thymidin (1 μ Ci/ml in RPMI mit Standardzusätzen ohne FKS). Nach Kulturende wurden die Platten bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut, um die Zellen zu zerstören. Die Ansätze wurden mit einem Erntegerät (Automash, Dynatech, Plochingen) auf Glasfaserfiltern gesammelt, die Filterscheiben getrocknet und in Zählfläschchen gegeben. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint I, Zinsser, Frankfurt) wurden die Proben im Szintillationszähler (Isocap 300, Nuncleon, Chicago, USA) gemessen. Die Ergebnisse als counts per minute (cpm) wurden wie folgt ausgewertet:

$$\text{Mittelwert der cpm: } \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$\text{Standardabweichung: } SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

n: Anzahl der Einzelergebnisse

Die spezifische Hemmung/Stimulation der allogenen Stimulation durch MAK und Komplement wurde nach folgendem Schema errechnet:

$$\frac{\text{Hemmung/}}{\text{Stimulation}} \quad (\text{in } \%) = \left[1 - \left(\frac{\text{AB}'/\text{MAK cpm} - \text{AA}'/\text{MAK cpm}}{\text{AB}'/\text{Med.cpm} - \text{AA}'/\text{Med.cpm}} \right) \right] \times 100$$

3.8 Markierung von Con A-Blasten

Ficollierte Lymphozyten wurden auf 2×10^6 Zellen/ml in RPMI (mit Standardzusätzen und 10 % FKS) eingestellt. Con A (Sigma, Deisenhofen) wurde in einer Konzentration von 25 µg/ml RPMI (mit Standardzusätzen, ohne FKS) gelöst. Die Zellen wurden mit dem Mitogen im Verhältnis 1 : 1 gemischt, als Kontrolle diente RPMI (mit Standardzusätzen ohne FKS).

Die Ansätze wurden in Zellkulturflaschen, im Brutschrank bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ für 72 h bebrütet.

Nach Kulturende wurden die Zellen zweimal mit PBS (mit 5 % FKS) gewaschen (10 min bei 450 x g) und in CF-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt.

Für die Untersuchung der Markierungsrate der gebildeten Blasten durch MAK wurden die Ansätze, wie in Kapitel 3.6 beschrieben, behandelt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Ig-Klassen, - Subklassen und Titer der MAK im Zellkulturüberstand

Im indirekten ELISA wurden die MAK auf ihre Zugehörigkeit zu den verschiedenen Immunglobulinklassen bzw. -subklassen untersucht, als positiv galten Extinktionswerte von 0,1 und größer.

Der Titer der MAK wurde im Zell-ELISA bestimmt.

Tabelle 1: Ig-Klassen und -Subklassen sowie Titer der MAK

MAK	Ig A	Ig M	Ig G ₁	Ig G _{2a}	Ig G _{2b}	Ig G ₃	Titer im Zell-ELISA
12V8.4	-	+	-	-	-	-	1 : 1024
12V9.1	-	-	+	-	-	-	1 : 640
15V28.2	-	-	+	-	-	-	1 : 256
16V6.9	-	-	-	-	+	-	1 : 5120
16V22.10	-	-	+	-	-	-	1 : 128
16V23.2	-	-	+	-	-	-	1 : 32
16V24.2	-	-	+	-	-	-	1 : 32
16V25.1	-	-	+	-	-	-	1 : 512
16V83.15	-	-	+	-	-	-	1 : 320
16V88.6	-	-	+	-	-	-	1 : 64
16V107.1	-	-	+	-	-	-	1 : 256
16V15.5	-	-	+	-	-	-	1 : 1280
16V15.10	-	-	+	-	-	-	1 : 10240
16V41.1	-	-	+	-	-	-	1 : 64
15V23.9	-	+	-	-	-	-	1 : 128
15V20.1	-	+	-	-	-	-	1 : 256
16V20.2	-	+	-	-	-	-	1 : 512
16V20.3	-	+	-	-	-	-	1 : 1024
16V40.10	-	+	-	-	-	-	1 : 512
FMS	+	+	+	+	+	+	1 : 10240
Ag8.653	-	-	-	-	-	-	0

Ag8.653: Zellkulturüberstand der zur Fusion benutzten Myelomzellen

4.2 Markierung von Schweinezellen mit MAK

4.2.1 Markierung der peripheren Lymphozyten

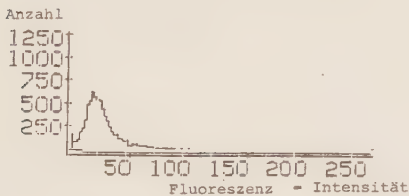
Die ficollierten Lymphozyten wurden mit den MAK inkubiert und die gebundenen Antikörper durch einen FITC-konjugierten Sekundärantikörper markiert.

Die Zellen wurden im Cytofluorographen auf ihre Größe (Forward Scatter) und Dichte (Right Scatter) hin untersucht. Durch Einstellung eines bestimmten Ausschnittes (Trigger-Region) konnten die Zellen in diesem Bereich selektiv untersucht und die Anzahl der fluoreszierenden Zellen bestimmt werden.

Angegeben sind die prozentualen Anteile fluoreszierender Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten in Tabelle 2.

Das Fluoreszenzprofil ist für jeden MAK typisch, zwei solcher Fluoreszenzprofile sind in Abbildung 1 dargestellt.

Abb. 1a: Gleichmäßige Fluoreszenzverteilung



Die Verteilung der Fluoreszenzintensität war bei den MAK unterschiedlich; prinzipiell fanden sich zwei Verteilungsmuster: Die Abb. 1a zeigt, am Beispiel des MAK 16V22.10, die Fluoreszenzverteilung auf den Zellen annähernd in Normalverteilung. Der MAK 16V6.9, der alle Leukozyten markierte, war unterschiedlich häufig auf den einzelnen Zellen nachzuweisen, wie Abb. 1b demonstriert.

Abb. 1b: Ungleichmäßige Fluoreszenzverteilung

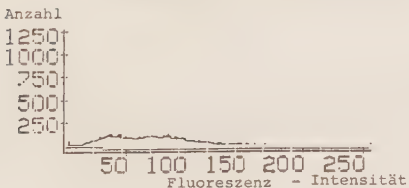


Abb. 1: Fluoreszenzprofil zweier MAK

Tabelle 2: Markierungsrate der Schweinelymphozyten
(Prozentsatz grünfluoreszierender Zellen)

Antikörper	n	$\bar{x}$	SD
FMS	19	97,4	1,1
12V8.4	19	6,5	3,8
12V9.1	17	93,4	2,8
15V28.2	18	2,0	1,6
16V6.9	17	92,5	3,1
16V22.10	18	77,2	11,6
16V23.2	18	73,4	12,5
16V24.2	16	65,4	15,6
16V25.1	18	55,9	17,6
16V83.15	17	24,6	7,6
16V88.6	18	1,2	1,1
16V107.11	17	51,1	18,8
15V23.9	7	0,9	0,6
16V15.5	6	7,8	4,8
16V15.10	6	8,3	5,4
16V41.1	7	9,7	4,8

4.2.2 Markierung verschiedener Zellarten des Schweins

Das Bindungsverhalten der MAK gegenüber verschiedenen Zellarten vom Schwein wurde im Cytofluorographen untersucht.

Die Zahlenwerte in Tabelle 3 geben den Prozentsatz grünfluoreszierender Zellen der jeweiligen Zellart an.

Tabelle 3: Markierungsraten der MAK an verschiedenen Zellpopulationen vom Schwein

Anti-körper	Lymphozyten	Granulozyten	Erythrozyten	Thrombozyten	Thymuszellen	Milzzellen
FMS	97,4	95,8	44,7	66,1	99,1	96,5
12V8.4	6,5	0	0	0	0	6,1
12V9.1	93,4	61,9	0	0	40,3	61,3
15V28.2	2,0	0	0	0	0	6,0
16V6.9	92,5	55,3	0	0	44,0	65,9
16V22.10	77,2	0	0	0	14,8	26,0
16V23.2	73,4	0	0	0	9,1	25,3
16V24.2	65,4	0	0	0	7,2	14,9
16V25.1	55,9	0	0	0	4,2	16,8
16V83.15	24,6	0	0	0	0,9	4,9
16V88.6	1,2	0	0	0	0	4,6
16V107.11	51,1	0	0	0	4,6	9,1
16V15.5	7,8	0	0	65,5	0	0
16V15.10	8,3	0	0	64,0	0	0
16V41.1	9,7	0	0	0	0	0
15V23.9	0,9	0	0	0	0	5,2

4.3 Bindungsvermögen der MAK an Leukozyten anderer Spezies

Zum Nachweis von speziesübergreifenden Reaktionen der MAK, die durch Immunisierung mit Schweinelymphozyten erzeugt wurden, sind die Leukozyten von Pferd, Mensch und Rind auf ihre Markierung durch die MAK untersucht worden. Die Auswertung erfolgte im Cytofluorographen.

Die Einzelwerte für die Bindung an die Leukozyten der verschiedenen Spezies sind aus Tabelle 4 ersichtlich. Dieje-

Tabelle 4: Bindungsvermögen der Monoklonalen Antikörper an Leukozyten anderer Spezies
(Prozentsatz grünfluoreszierender Zellen im Cytofluorographen)

Antikörper	Schwein			Pferd			Rind			Mensch		
	Lympho- zyten	Granulo- zyten		Lympho- zyten	Leuko- zyten		Lympho- zyten	Granulo- zyten		Lympho- zyten	Leuko- zyten	Granulo- zyten
FMS	97,4	95,8		97,0	94,3		5,3	93,0		5,3	13,1	4,6
12V8.4	6,5	0,5		13,2	24,6		0	3,2		0,7	0,9	ND
12V9.1	93,4	61,4		90,9	91,8		75,1	90,8		51,1	90,3	91,7
15V28.2	2,0	0		1,3	0		0	0,2		0	1,7	96,5
16V6.9	92,5	54,8		64,6	80,0		0	79,0		0	1,2	ND
16V22.10	77,2	1,2		71,8	80,7		45,7	62,8		0	1,2	ND
16V23.2	73,4	0,5		64,0	72,2		30,9	32,8		20,8	1,2	ND
16V24.2	65,4	0,3		57,7	70,9		25,3	21,5		14,1	0,8	ND
16V25.1	55,9	0,2		53,2	62,5		19,8	30,5		12,4	1,0	ND
16V83.15	24,6	0,6		13,8	17,4		18,8	2,5		8,1	1,5	ND
16V88.6	1,2	0		0	1,5		0	0,4		10,2	0,5	ND
16V107.11	51,1	0		42,2	52,1		13,8	13,2		ND	0,7	ND
15V20.1	10,6	95,4		13,9	53,9		0	90,3		4,4	0,9	ND
16V15.5	7,8	0		0,6	0		0	0,9		ND	2,3	0
16V15.10	8,3	0		0	0,8		0	0		ND	0,8	ND
16V20.2	4,6	94,7		18,0	56,5		0	92,3		ND	0,9	ND
16V20.3	6,4	94,6		12,8	51,7		0	90,5		ND	1,2	0
16V40.10	7,9	95,6		15,3	51,9		0	91,2		ND	1,3	0
										ND	0,4	0,4

ND: nicht durchgeführt

nigen MAK, die auf Leukozyten vom Pferd binden, haben eine dem Schwein sehr ähnliche Markierungsrate. Einige der MAK, die beim Schwein geringe Prozentzahlen bei der Markierung von Granulozyten zeigen, weisen beim Pferd deutlich höhere Werte bei der Granulozytenmarkierung auf.

Zur Bindung mit den Leukozyten aller vier Spezies war nur der MAK 12V9.1 fähig, wobei ein ähnlich hoher Prozentsatz bei Schwein, Pferd, Mensch und Rind markiert wurde. Das als Positivkontrolle eingesetzte FMS konnte nur wenige Leukozyten von Mensch und Rind markieren.

4.4 Bindung der MAK an angereicherte Lymphozyten- subpopulationen

4.4.1 Trennung durch E-Rosettensedimentation

Das Bindungsverhalten der MAK an die E-Rosetten-positive Fraktion (E^+) und im Vergleich dazu an die E-Rosetten-negative Fraktion (E^-) wurde im Cytofluorographen untersucht.

Der Erfolg der Auftrennung ist durch Angabe der Protein A-positiven Zellen in den beiden Fraktionen in der Tabelle 5a dargestellt. Die Zahl der Protein A-negativen Zellen ist aus den Versuchsdaten errechnet worden.

Nach der E-Rosettensedimentation teilten sich die Zellen in beiden Fraktionen wie folgt auf:

Periphere Blutlymphozyten:	100 %
E-Rosetten-positive Zellen:	74,2 %
E-Rosetten-negative Zellen:	25,8 %

In Tabelle 5b ist die Markierung der beiden Fraktionen durch die MAK als Prozentsatz grünfluoreszierender Zellen wiedergegeben.

Die Angaben für die sehr niedrig markierenden MAK sind nur unter Vorbehalt zu sehen, da in diesem Meßbereich erhebliche Schwankungen auftraten.

Tabelle 5 : Trennung durch E-Rosettensedimentation

Tabelle 5a: Kontrolle der Auftrennung mit Protein A
Zahlenangaben als Prozentsatz grünfluoreszierender Zellen

	PBL	E-Rosetten- positiv	Zu-/Ab- nahme	E-Rosetten- negativ	Zu-/Abnahme
Protein A positiv	9,8	7,3	- 25,5 %	12,0	+ 22,4 %
Protein A negativ	90,2	92,7	+ 2,8 %	88,0	- 2,4 %

Tabelle 5b: Bindung der E⁺- und E⁻-Zellen durch MAK
Zahlenangaben als Prozentsatz grünfluoreszierender Zellen

Anti- körper	PBL	E-Rosetten- positiv	Zu-/Ab- nahme	E-Rosetten- negativ	Zu-/Abnahme
FMS	95,8	94,2	- 1,7 %	79,6	- 16,1 %
12V8.4	11,7	5,7	- 51,3 %	2,4	- 79,5 %
12V9.1	86,4	92,0	+ 6,5 %	67,7	- 21,6 %
15V28.2	1,9	0	- 100 %	1,2	- 36,8 %
16V6.9	86,6	91,7	+ 5,9 %	82,3	- 3,0 %
16V22.10	76,1	75,5	- 0,8 %	69,9	- 8,1 %
16V23.2	67,9	75,4	+ 11,0 %	57,5	- 15,3 %
16V24.3	62,2	66,5	+ 6,9 %	50,3	- 19,7 %
16V25.1	48,7	46,9	- 3,7 %	25,5	- 47,6 %
16V83.15	29,1	23,0	- 21,0 %	16,0	- 45,0 %
16V88.6	1,3	0	- 100 %	0,2	- 84,6 %
16V107.11	46,3	46,5	+ 0,4 %	38,9	- 16,0 %
16V15.5	ND	ND		ND	
16V15.10	ND	ND		ND	
16V41.1	ND	ND		ND	
15V23.9	ND	ND		ND	

4.4.2 Trennung durch E-Rosettensedimentation und Panning

In diesem Versuchsansatz wurde nur die Markierung der E⁺-Zellen, die sich nach Panning im Überstand befanden, untersucht. Der Erfolg der Auftrennung ist in Tabelle 6a dargestellt, die Bindung der MAK an die E⁺-Zellen, die keine Adhärenz zeigten (Panning-negativ) in Tabelle 6b, dargestellt als Prozentsatz grünfluoreszierender Zellen.

Tabelle 6a: Bindung von Protein A

	PBL	E-Rosetten-positiv Panning negativ	Zu-/Abnahme
Protein A positiv	9,9	1,3	- 86,9 %
Protein A negativ	90,1	98,7	+ 9,5 %

Tabelle 6b: Bindung der MAK an die E⁺-, Panning⁻-Zellen

Antikörper	PBL	E-Rosetten-positiv Panning negativ	Zu-/Abnahme
FMS	94,5	71,2	- 24,7 %
12V8.4	9,9	5,0	- 49,5 %
12V9.1	91,8	94,3	+ 2,7 %
15V28.2	1,5	0,5	- 66,0 %
16V6.9	88,6	94,4	+ 6,5 %
16V22.10	73,1	82,9	+ 13,4 %
16V23.2	60,4	76,2	+ 26,2 %
16V24.2	52,9	61,9	+ 17,0 %
16V25.1	30,7	60,5	+ 97,9 %
16V83.15	32,3	25,2	- 22,0 %
16V88.6	0,3	0,5	+ 66,0 %
16V107.11	32,8	42,0	+ 28,0 %
16V15.5	16,3	13,1	- 19,6 %
16V15.10	16,7	14,0	- 16,2 %
16V41.1	13,9	1,0	- 92,8 %
15V23.9	0,7	0	- 100 %

4.4.3 Trennung durch Nylonwolle und durch Panning

T-Zellen wurden angereichert durch Passage über Nylonwolle-Säulen, die die B-Zellen zurückhielten. B-Zellen wurden durch Panning angereichert, wobei in diesem Fall die adhärenenten Zellen gewonnen wurden.

Die in der Nylonwolle-Säule nicht adhärenenten Zellen, Nylonwolle⁻, und die beim Panning adhärenenten Zellen, Panning⁺, wurden zur Kontrolle auf ihre Markierung durch Protein A untersucht, diese Ergebnisse zeigt Tabelle 7a. Die Markierung der MAK in den Fraktionen zeigt Tabelle 7b. Die Zahlenwerte geben den Prozentsatz grünfluoreszierender Zellen an.

Tabelle 7a: Markierung mit Protein A

	PBL	Nylonwolle- negativ	Zu-/Ab- nahme	Panning- Adhärenente	Zu-/Ab- nahme
Protein A positiv	5,9	1,1	- 81,4 %	21,2	+259,3 %
Protein A negativ	94,1	98,9	+ 5,1 %	78,8	- 16,3 %

Tabelle 7b: Bindung der MAK an die Nylonwolle⁻ und die Panning⁺-Zellen

Antikörper	PBL	Nylonwolle- negativ	Zu-/Ab- nahme	Panning- Adhärenze	Zu-/Ab- nahme
FMS	95,9	98,4	+ 2,6 %	89,0	- 7,2 %
12V8.4	7,1	3,8	- 46,5 %	2,1	- 70,4 %
12V9.1	ND	ND		ND	
15V28.2	1,4	0	- 100 %	3,6	+157,1 %
16V6.9	ND	ND		ND	
16V22.10	ND	ND		ND	
16V23.2	82,6	86,8	+ 4,8 %	57,7	- 30,1 %
16V24.2	ND	ND		ND	
16V25.1	61,6	70,9	+ 15,1 %	44,5	- 27,8 %
16V83.15	ND	ND		ND	
16V88.6	0,2	0,7	+ 250 %	0,9	+350,0 %
16V107.11	ND	ND		ND	
16V15.5	ND	ND		ND	
16V15.10	ND	ND		ND	
16V41.1	8,7	1,6	- 81,6 %	18,3	+110,3 %
15V23.9	ND	ND		ND	

ND: nicht durchgeführt

4.4.4 Markierung von Makrophagen

Die Abtrennung erfolgte durch Adhärenz der Makrophagen an Plastikoberflächen während einer Inkubation bei 37°C. Die Überprüfung der Isolierung erfolgte durch Vergleich der Fraktionen im Cytofluorographen; angegeben sind für die Zelldichte und -größe die Skalenwerte des Cytofluorographen sowie deren Standardabweichung in Tabelle 8a. Die Zahlenwerte für die Markierungsraten in Tabelle 8b drücken den Prozentsatz grünfluoreszierender Zellen in der jeweiligen Population aus.

Tabelle 8a: Zelldichte und -größe der Populationen

	periphere Lymphozyten	nichtadhärente Zellen	adhärente Zellen
mittlere Zellgröße/ $\pm$ SD	106,4/23,1	107,6/20,1	113,8/20,9
mittlere Zelldichte/ $\pm$ SD	41,0/19,6	37,8/18,1	46,8/20,2
Anteil der Population	100 %	93 %	7 %

Tabelle 8b: Markierung von Makrophagen

Antikörper	periphere Lymphozyten	nichtadhärente Lymphozyten	adhärente Makrophagen
FMS	97,4	88,7	72,5
12V8.4	6,5	7,2	0,1
15V28.2	2,0	1,1	0
16V6.9	92,5	90,3	76,2
16V22.10	77,2	ND	ND
16V23.2	73,4	ND	47,5
16V24.2	65,4	54,9	35,1
16V25.1	55,9	42,7	25,7
16V83.15	24,6	16,1	4,7
16V88.6	1,2	0,3	0
16V107.11	51,1	33,2	22,7
15V23.9	0,9	ND	0,2

ND: nicht durchgeführt

4.4.5 Markierung von Zellen mit Fc-Rezeptoren

Nach Abtrennung der ebenfalls Fc-Rezeptoren tragenden Makrophagen wurden die Lymphozyten nach Zellen, die Rezeptoren für den Fc-Teil von IgG tragen, sowie nach Zellen, die Rezeptoren für den Fc-Teil von IgM tragen, getrennt. Die Lymphozyten, die sich nach der Inkubation nicht an

die Plastikschaalen mit den Kaninchenantikörpern geheftet hatten, wurden als Fc γ - bzw. Fc μ -negativ bezeichnet. Die adhärenenten Lymphozyten wurden als Fc γ - bzw. als Fc μ -positiv bezeichnet. Die Zahlenwerte in Tabelle 9 geben den Anteil der durch die MAK markierten Zellen in Prozent der grünfluoreszierenden Zellen der jeweiligen Gesamtpopulation wieder.

Tabelle 9: Markierung von Zellen mit Fc-Rezeptoren

Antikörper	PBL	Fc μ - positiv	Fc μ - negativ	Fc γ - positiv	Fc γ - negativ
FMS	97,4	79,4	57,6	62,8	24,8
12V8.4	7,2	0	1,1	1,9	2,5
12V9.1	ND	ND	ND	ND	ND
15V28.2	1,1	0,5	0	0	0,3
16V6.9	90,3	88,7	90,8	94,1	94,0
16V22.10	ND	ND	ND	ND	ND
16V23.2	64,3	35,7	51,7	51,0	66,0
16V24.2	54,9	32,0	49,0	38,1	61,0
16V25.1	42,7	39,0	33,4	29,7	33,7
16V83.15	16,1	2,0	11,9	5,3	12,0
16V88.6	0,3	0	0	0,2	0,3
16V107.11	33,2	21,4	29,2	27,9	34,7
15V23.9	3,0	1,8	0	1,1	1,1

ND: nicht durchgeführt

4.5 Komplementabhängige Zytotoxizität der MAK

Die Auswertung dieses Versuchs erfolgte im Cytofluorogrammen durch den Nachweis von roter Fluoreszenz, hervorgerufen durch die Anfärbung der Zellkerne toter Zellen mit Ethidiumbromid.

Der Vorteil dieses Nachweisverfahrens lag in der einfa-

chen Auswertung, der guten Reproduzierbarkeit und der Aus-
sagesicherheit durch Untersuchung großer Zellzahlen, im
Vergleich zur Bestimmung toter Zellen durch Trypanblau;
In Tabelle 10 sind die Ergebnisse als der Prozentsatz rot-
fluoreszierender Zellen angegeben; als Vergleich dienen
die Markierungsraten an Peripheren Blutlymphozyten aus
Tabelle 2.

Tabelle 10: Komplementabhängige Zytotoxizität der MAK
gegenüber Zielzellen

Antikörper	spezifische Zytotoxi- zität in %	Markierungsrate peripherer Lymphozyten in %
FMS	100	97,4
12V8.4	0	6,5
12V9.1	19,1	93,4
15V28.2	0,7	2,0
16V6.9	39,5	92,5
16V22.10	4,8	77,2
16V23.2	1,4	73,4
16V24.2	10,8	65,4
16V25.1	0,4	55,9
16V83.15	0,5	24,6
16V88.6	0,3	1,2
16V107.11	5,1	51,1
15V23.9	6,4	0,9
16V15.5	1,4	7,8
16V15.10	4,1	8,3
16V41.1	21,9	9,7

4.6 Beeinflussung der mitogenen Stimulierbarkeit

Der Einfluß der MAK auf die mitogene Stimulierbarkeit von Schweinelymphozyten wurde durch Behandlung der Zellen mit MAK und Komplement vor der mitogenen Stimulation untersucht. Die Inkorporation von ^{14}C -Thymidin in den Testansätzen, im Vergleich zu den Kontrollansätzen, sollte zeigen, ob die verbliebenen Zellen noch fähig waren, auf Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (Con A), Poke-weed Mitogen (PWM) und Lipopolysaccharid (LPS) zu reagieren. Da in keinem Falle eine Stimulation durch LPS auftrat, blieben diese Ergebnisse unberücksichtigt.

Hervorzuheben ist, daß MAK nicht nur hemmend auf die mitogene Stimulation wirken, sondern auch stimulieren können. In vielen Fällen erhöht ein MAK die PHA-Stimulation und hemmt die PWM-Antwort oder umgekehrt.

Die MAK 15V28.2 und 16V22.10 erhöhen die Stimulationsindex sowohl bei PHA als auch bei PWM; die MAK 16V6.9, 16V83.15 und 16V41.1 reduzieren die Stimulationsindices bei allen untersuchten Mitogenen.

Ausnahmslos von allen MAK wird die Reaktion auf Con A stark gehemmt. Die Ergebnisse sind dargestellt in Tabelle 11.

4.7 Beeinflussung der Mixed Lymphocyte Reaction

Lymphozyten können durch allogene Lymphozyten stimuliert werden, um die Reaktion für ein Individuum aussagefähig zu machen, werden die Zellen des anderen Individuums inaktiviert.

Um den Einfluß der MAK auf die bei der Mixed Lymphocyte Reaction stimulierten Zellen zu untersuchen, wurden die als Effektorzellen dienenden Lymphozyten vor Kulturbeginn mit den MAK und Komplement inkubiert.

Tabelle 11: Beeinflussung der mitogenen Stimulierbarkeit durch MAK und Komplement
Ansatz I

Antikörper	Medium cpm	PHA cpm	Hemmung	Stimulation	Con A cpm	Hemmung	PWM cpm	Hemmung	Stimulation	Medium cpm
Medium	29,7	3669,2			825,3		1992,3			57,5
FMS	19,8	85,7	98 %		30,3	98 %	29,8	99 %		16,0
12V8.4	20,3	1738,2	53 %		189,0	79 %	3650,7		87 %	31,0
12V9.1	21,8	1865,5	49 %		424,0	49 %	2137,8		9 %	35,5
15V28.2	25,3	4481,5		22 %	283,0	68 %	3288,7		68 %	39,0
16V6.9	14,7	28,0	100 %		19,3	100 %	34,3	99 %		17,5
16V22.10	22,5	5487,8		50 %	118,8	88 %	3120,0		60 %	23,7
16V23.2	30,8	2881,2	22 %		238,3	73 %	2104,3		7 %	28,8
16V24.2	30,0	3774,2		3 %	34,5	100 %	1511,7	23 %		31,0
16V25.1	16,5	5872,0		61 %	69,5	94 %	1162,0	41 %		20,7
16V83.15	18,5	1984,7	45 %		90,0	91 %	1255,2	36 %		18,2
16V88.6	23,3	5814,0		59 %	47,0	97 %	944,3	53 %		27,8
16V107.11	27,5	5061,0		38 %	119,7	88 %	639,0	68 %		27,3
16V15.5	18,5	2547,3	31 %		28,7	98 %	2010,5		3 %	13,5
16V15.10	22,3	5727,2		57 %	15,8	100 %	1613,8	18 %		20,8
15V23.9	19,0	4347,0		19 %	66,2	96 %	415,5	80 %		33,5

Ansatz II

Medium	118,5	5990,2			1312,0		6552,2		
16V41.1	60,0	2980,5	50 %		326,8	78 %	2417,8	78 %	

In der Tabelle 12 sind die Werte für den Einbau von ^{14}C -Thymidin angegeben, als Kontrolle dienten Medium bzw. Fusionsmausserum.

Tabelle 12: Beeinflussung der Mixed Lymphocyte Reaction durch MAK und Komplement

Antikörper	Lymphozyten A - B' [cpm]	Lymphozyten A - A' [cpm]	Hemmung	Stimulation
Medium	68,2	39,2		
FMS	13,7	18,0		
12V8.4	52,3	40,0	58 %	
12V9.1	ND	ND		
15V28.2	52,2	19,8		12 %
16V6.9	ND	ND		
16V22.10	29,2	13,7	47 %	
16V23.2	46,3	18,3	5 %	
16V24.2	40,5	19,7	28 %	
16V25.1	56,8	34,3	22 %	
16V83.15	33,3	15,2	38 %	
16V88.6	37,8	20,8	40 %	
16V107.11	50,7	14,5		25 %
16V15.5	23,5	13,2	64 %	
16V15.10	35,8	33,7	93 %	
16V41.1	29,5	13,7	46 %	
15V23.9	40,5	32,5	72 %	

ND: nicht durchgeführt

4.8 Markierung von Con A-Blasten

Die Markierungsrate der Con A-Blasten wurde durch indirekte Immunfluoreszenz im Cytofluorographen bestimmt.

Die Angaben in den Tabellen 13a und 13b beziehen sich auf den Prozentsatz grünfluoreszierender Zellen. Zur Kontrolle wurden Lymphozyten 72 h ohne Con A inkubiert.

Tabelle 13a: Ansatz I Markierung von Con A-Blasten

Antikörper	Kontrolle	Con A-Blasten
FMS	82,7	68,8
12V8.4	5,7	68,8
12V9.1	73,0	54,2
15V28.2	10,7	14,0
16V6.9	75,6	48,4
16V22.10	58,1	26,7
16V24.2	61,0	22,5
16V25.1	57,6	29,8
16V83.15	15,5	28,4
16V88.6	1,2	18,3
16V107.11	55,5	27,6
Protein A	46,0	70,4

Tabelle 13b: Ansatz II Markierung von Con A-Blasten

Antikörper	Kontrolle	Con A-Blasten
FMS	52,5	79,7
12V8.4	0,2	11,3
16V23.2	0	3,0
16V83.15	0	0
15V23.9	12,4	57,6
16V15.5	0	4,3
16V15.10	1,1	5,4

5. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Differenzierungsantigene von Lymphozytensubpopulationen mit Hilfe von Monoklonalen Antikörpern (MAK) zu identifizieren. Die MAK waren durch Immunisierung von Mäusen mit peripheren Blutlymphozyten vom Schwein und anschließende Fusion der Mäuselplazentazellen mit Myelomzellen erzeugt worden. Man konnte deshalb eine Vielzahl von unterschiedlichen MAK erwarten, da im strömenden Blut sehr viele Subpopulationen von Lymphozyten zu finden sind. Neben einer ganzen Anzahl von MAK, die nicht für Differenzierungsantigene spezifisch sind (PESCOVITZ et al., 1984), war auch mit der Produktion solcher MAK zu rechnen, die Subpopulationen von Lymphozyten zu definieren vermögen.

Aus der großen Palette von in unserer Abteilung produzierten MAK sind für diese Arbeit 15 ausgewählt und einer genaueren Untersuchung unterzogen worden. Als IgM-Antikörper wurden die MAK 12V8.4, 15V20.1, 16V20.2, 16V20.3 und 16V40.10 bestimmt; alle anderen MAK wurden dem IgG-Isotyp zugeordnet, wobei bis auf den MAK 16V6.9 (IgG_{2b}) die anderen als IgG₁ charakterisiert wurden.

Zur Untersuchung der Charakteristika der MAK gehörte nicht nur der Nachweis ihrer Bindungsraten an angereicherten Zellen, sondern auch die Bestimmung des Einflusses auf Lymphozytenfunktionen. Da angenommen werden konnte, daß die MAK im Zusammenwirken mit Komplement Zellen zu lysieren vermögen, wurde den funktionellen Versuchen jeweils eine Inkubation mit MAK und Komplement vorgeschaltet. Im Zytotoxizitätstest, der wegen der einfachen Durchführung und der guten Reproduzierbarkeit im Cytofluorographen durchgeführt wurde, divergierten der Prozentsatz gebundener Zellen und der Prozentsatz spezifisch abgetöteter Zellen erheblich. Die Zytotoxizität blieb bei allen MAK, mit Ausnahme der MAK 15V23.9, 16V41.1 und 16V94.7,

weit unter der Markierungsrate für periphere Blutlymphozyten. Trotzdem ließen sich auch bei den schwach zytotoxischen MAK deutliche Reaktionen auf die verschiedenen Funktionstests nachweisen. Über solche Effekte von MAK berichten auch DAMLE et al. (1985) und VAICKUS et LEVY (1985), wobei mehrere Mechanismen für möglich gehalten werden, so z.B. die Blockade der für die Zell-Zell-Interaktionen verantwortlichen Rezeptoren. Solche MAK bedürfen daher noch weiterer Untersuchungen in dieser Richtung.

Der Versuch, Zellen mittels ihrer Fc-Rezeptoren nach T-Helfer- und T-Suppressorzellen aufzutrennen, hat für keinen der MAK in der Markierungsrate deutliche Ergebnisse erbracht, so daß in der Diskussion diese Resultate unberücksichtigt bleiben. Der Versuchsaufbau bedarf in weiterführenden Untersuchungen noch einer Überprüfung.

Der MAK 12V9.1 markiert fast alle peripheren Lymphozyten, einen Großteil der Granulozyten sowie einen kleinen Anteil von Thymozyten und keine Milzzellen. Interessanterweise reagiert er speziesübergreifend bei Pferd, Mensch und Rind mit Lymphozyten und Granulozyten; Untersuchungen an anderen Spezies stehen aber noch aus. MIERAU et CRAMER (1985) berichten über einen MAK, der gegen ein H-2D^b-Antigen der Maus gerichtet ist und eine monomorphe Spezifität für HLA-A/-B/-C-Antigen des Menschen aufweist. Andere konnten solche speziesübergreifenden Spezifitäten für MAK belegen, die gegen Ia-Antigene gerichtet sind (PIERRES et al., 1981; SHINOHARA et SACHS, 1981). Dieser MAK reduziert die Reaktion auf PHA und Con A gleichermaßen um etwa die Hälfte, die Reaktion auf PWM wird leicht stimuliert.

Der MAK 16V6.9 (IgG_{2b}) zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster an Zellen vom Schwein wie 12V9.1 und markiert auch Makrophagen; Leukozyten vom Pferd werden durch ihn erkannt, nicht jedoch die von Mensch und Rind. Seine Zytotoxizität ist stärker als die von 12V9.1 und er reduziert

die Stimulierbarkeit durch Mitogene fast vollständig. Auch Con A-Blasten werden durch 16V6.9 nur zu annähernd 50 % markiert. Seine Spezifität dürfte wahrscheinlich das gemeinsame Leukozytenantigen sein, und er ist damit dem MAK 74-9-3 von PESCOVITZ et al. (1984) vergleichbar.

Die MAK 16V22.10 und 16V23.2 markieren beide über 70 % der peripheren Lymphozyten und keine Granulozyten; sie binden fast vollständig an T-Zellen und 16V23.2 auch an fast 50 % der Monozyten (für 16V22.10 noch nicht bestimmt), jedoch anscheinend nur schwach an Thymozyten. Ihre Zytotoxizität ist gering; sie reduzieren aber die Stimulation in der Mixed Lymphocyte Reaction (MLR) und auf Con A; die Reaktion auf PHA wird nur von 16V23.2 gehemmt, während die PWM-Stimulationsrate durch beide noch erhöht wird. Con A-Blasten wurden durch 16V22.10 zu etwa der Hälfte, im Vergleich zur Kontrolle, markiert. Diese Ergebnisse lassen sich mit denen für den MAK TA-1 des Menschen vergleichen, der aber zusätzlich etwa ein Drittel der Thymozyten markiert, was aber beide MAK nicht erreichen (LEBIEN et KERSEY, 1980).

Gemeinsame Eigenschaften weisen die MAK 16V24.2 und 16V25.1 auf; sie markieren 65 bzw. 55 % der peripheren Lymphozyten und ihre Markierungsrate in den T-Zellfraktionen nimmt etwa in dem Maße zu, in dem die Protein A negativen Zellen zunehmen. Monozyten werden durch beide zu 35 bzw. 25 % gebunden, Milzzellen zu etwa 15 % und Thymozyten unter 10 %. Ihre Zytotoxizität ist ebenfalls gering und trotzdem reduzieren sie die Antwort auf Con A fast vollständig und die Reaktion auf PWM um 23 bzw. 41 %. Die PHA-Stimulationsrate wird im Gegensatz um 3 bzw. 61 % erhöht. An Con A-Blasten binden sie zu einem Drittel bzw. der Hälfte der Kontrollen. Diese Ergebnisse lassen die MAK 16V24.2 und 16V25.1 als T-Zellmarker erscheinen, was durch ihr Bindungsverhalten an periphere Lymphozyten sowie ihren Einfluß auf die MLR und die Con A-Stimulation

belegt wird.

Ebenfalls ein Marker für T-Zellen ist der MAK 16V107.11, der in den Anreicherungen für T-Zellen in dem Maße mehr markiert, wie die Protein A-negativen Zellen zunehmen, und in der Markierungsrate abfällt, wie die Protein A-negativen Zellen abnehmen. An Monozyten bindet er zu gut 20 %, an Granulozyten nicht. Seine Zytotoxizität ist gering; als einziger der für T-Zellen spezifischen MAK förderte er die MLR. 16V107.11 förderte die PHA-Stimulation und reduzierte die Antwort auf Con A und PWM. Ob 16V107.11 eine Subpopulation markiert, kann noch nicht ausgesagt werden.

Der MAK 16V83.15 reagierte mit einem Antigen, das auf etwa 25 % der peripheren Lymphozyten vorhanden ist und sich durch diesen MAK auf Monozyten zu einem geringen Teil und auf Granulozyten gar nicht nachweisen läßt. Durch E-Rosettensedimentation konnte in keiner der erhaltenen Fraktionen ein erhöhtes Bindungsvermögen für ihn festgelegt werden. Lymphozyten wurden in ihrer Antwort auf die Mitogene PHA, Con A und PWM durch 16V83.15 gehemmt, wobei die Reduktion der Con A-Stimulierbarkeit annähernd 100 % betrug, bei PHA 45 % und bei PWM 36 %. Con A-Blasten wurden durch 16V83.15 etwa doppelt so häufig markiert wie die Kontrollzellen. Die Reduktion der Antwort in der MLR machte 38 % aus. Zum jetzigen Zeitpunkt kann man soviel aussagen, daß 16V83.15 Con A-aktivierte Zellen und deren Vorläufer erkennt, sowie die Zellen die in der MLR proliferieren. Hier ist ein komplexer Zusammenhang anzunehmen, wie er auch von DAMLE et al. (1985) beschrieben wird für die Erkennung, Stimulation und Effektorphase bei T-Helfer- und T-Suppressorzellen. Weitere eigene Untersuchungen zu diesem Aspekt stehen noch aus.

Eine fast identische Aussage kann man auch über den IgM-Antikörper 12V48.4 machen, der zwar weniger periphere Lymphozyten erkennt, aber sich in den Anreicherungen

und Funktionstesten noch ausgeprägter und gleichmäßiger verhält als der MAK 16V83.15; eine Ausnahme macht 12V8.4 nur insoweit, als daß er die Stimulation durch PWM stark fördert.

Für den MAK 16V88.6 und den MAK 15V23.9 kann ein Reaktionsmuster wie bei den vorher diskutierten nur teilweise belegt werden. Sie verhalten sich zwar genauso bei der Markierung von Con A-Blasten wie 12V8.4 und 16V83.15, aber ihre Bindungsfähigkeit an periphere Lymphozyten und Zellanreicherungen war so gering, daß eindeutige Aussagen wegen der großen Streuung in diesem Bereich nicht möglich sind. Sie hemmen deutlich die MLR, ihre Einwirkung auf die mitogene Stimulierbarkeit durch PHA und Con A ist aber genau umgekehrt wie bei 12V8.4, d.h. 16V88.6 und 15V23.9 fördern die Stimulation durch PHA etwa in dem Ausmaß, wie 12V8.4 sie hemmt; für PWM gilt das gleiche nur umgekehrt. In diesem Zusammenhang sei auf die Arbeit von VAICKUS et LEVY (1985) verwiesen, die für zwei antiproliferative MAK ebenfalls keinen direkten Zusammenhang mit der Markierungsrate bei der indirekten Immunfluoreszenz und mit der Fähigkeit, die Proliferation verschiedener Zelllinien zu hemmen, feststellen.

Mit einer ebenfalls sehr niedrigen Markierungsrate für periphere Lymphozyten steht der MAK 15V28.2 in der gleichen Gruppe wie die oben erwähnten MAK. Zum Unterschied erhöht er aber die Stimulation durch PHA, PWM und durch die MLR.

Wenn man die Marker für T-Zellen und ihre Einflüsse auf Lymphozytenfunktionen mit denjenigen der Marker für Con A-Blasten vergleicht, so lassen sich im Moment folgende Aussagen machen: Je mehr Zellen durch die MAK beider Gruppen markiert werden, um so stärker fiel die PWM-Stimulation aus. Die MLR wird mit steigender Markierungsrate durch die T-Zellmarker vermehrt gehemmt (Ausnahme 16V107.11), die Marker von Con A-Blasten lassen sich

nicht so einordnen. Der Einfluß auf die PHA-Stimulation stellte sich für beide Gruppen genau gegenteilig dar: Je höher der Titer der Zellkulturüberstände war, um so mehr wurde die PHA-Stimulation durch die T-Zellmarker gefördert und von den Markern der Con A-Blasten gehemmt. Statistisch abgesichert sind diese Beziehungen noch nicht und bedürfen weiterer Versuche.

Als klare Thrombozytenmarker haben sich die MAK 16V15.5 und 16V15.10 erwiesen; sie markieren etwa zwei Drittel der Thrombozyten und etwa 8 % der peripheren Lymphozyten. Milzzellen, Thymozyten und Granulozyten werden gar nicht gebunden. Eine Untersuchung über ihr Verhalten in Anreicherungen für Monozyten wurde noch nicht durchgeführt, so daß eine Aussage über eine mögliche Analogie zu OKM-5 des Menschen verfrüht ist. OKM-5 bindet beim Menschen Thrombozyten und Monozyten. Immerhin weisen beide MAK Einflüsse auf die von Monozyten mitgetragene Antwort auf Mitogene auf. Sie reduzieren die Antwort auf Con A vollständig; durch 16V15.5 wird die PWM-Stimulation leicht gefördert und die Stimulation durch PHA zu einem Drittel gehemmt. 16V15.10 hemmt dagegen die PWM-Stimulation und fördert diejenige auf PHA. Die MLR wird durch beide stark gehemmt.

Für den MAK 16V41.1 kann man mit gewisser Wahrscheinlichkeit eine Spezifität für B-Zellen annehmen, da er bei einer Markierungsrate von etwa 10 % der peripheren Lymphozyten in den Anreicherungsversuchen die Zellen parallel zur Ab- oder Zunahme der Protein A-positiven Zellen markiert. Eine sehr schwache Bindungsfähigkeit an Thymozyten besteht, jedoch wurden Granulozyten und Milzzellen nicht gebunden. Mit Monozyten wurde 16V41.1 noch nicht untersucht. Er vermag im Zytotoxizitätstest immerhin 23 % der Zellen spezifisch abzutöten. In den funktionellen Versuchen reduziert er zu etwa 50 bis 75 % die Antwort auf die Mitogene PHA, Con A und PWM und die

Reaktion auf die MLR. Wenn man davon ausgeht, daß alle diese Reaktionen auch von einer Vermittlung der B-Zellen mitgetragen werden, wie es auch HAMMERBERG et SCHURIG (1986) annehmen, so kann die Aussage, daß der MAK 16V41.1 B-Zellen markiert, aufrechterhalten werden.

Zum Schluß soll noch auf speziesübergreifende Eigenschaften einiger MAK verwiesen werden, die bei der Diskussion noch nicht berücksichtigt wurden.

Die MAK 16V22.10, 16V23.2, 16V24.2, 16V25.1, 16V83.15 und 16V107.11 markieren über die vorher erläuterten Ergebnisse hinaus auch Leukozyten von Pferd und Rind, wobei für die meisten MAK eine geringere Markierung beim Rind als beim Pferd festzustellen ist. Überraschenderweise markieren diese MAK bei Pferd und Rind auch Granulozyten, während sie das beim Schwein nicht tun. Eine andere Gruppe von MAK mit speziesübergreifender Reaktion sind die MAK 15V20.1, 16V20.2, 16V20.3 und 16V40.10. Sie markieren bei Schwein und Pferd fast ausschließlich Granulozyten, während sie mit Zellen von Mensch und Rind nicht reagieren.

Die für den MAK 12V9.1 weiter oben diskutierte Eigenschaft, an alle Leukozyten von Schwein, Pferd, Rind und Mensch zu binden, ist auch insofern erwähnenswert, als daß das zur Positivkontrolle verwendete Fusionsmausserum zwar auch mit Leukozyten vom Pferd reagierte, bei Rind und Mensch aber nur 5 bzw. 13 % der Zellen markierte.

Weitere Charakterisierung der Monoklonalen Antikörper ist erforderlich, um die aufgezeigten interessanten Eigenschaften vieler MAK genauer darzustellen; hierzu bieten sich vor allem funktionelle Versuche an, wie z.B. der Einfluß der MAK auf bestimmte Effektorfunktionen oder die Beeinflussung von Zellen durch MAK ohne die Zugabe von Komplement.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden 15 Monoklonale Antikörper untersucht, die durch Immunisierung mit Schweinelymphozyten erzeugt worden waren. Die Hybridomas aus Mäusemyelom- und Mäusemilzzellen produzierten Antikörper sowohl vom IgM wie auch vom IgG Isotyp; mit diesen Monoklonalen Antikörpern wurde die Unterscheidung von Lymphozytensubpopulationen versucht.

Durch Anwendung der E-Rosettensedimentation, der Filtrierung über Nylonwolle-Säulen und durch Adhärenz an beschichtete Plastikschalen (Panning) wurden die Lymphozyten aufgetrennt und die Bindung der MAK an die verschiedenen Fraktionen untersucht.

Zur Bestimmung des Einflusses der MAK auf funktionell unterscheidbare Lymphozytenpopulationen wurden Lymphozyten vor Beginn der Versuche mit MAK und Komplement behandelt und anschließend entweder durch pflanzliche Mitogene oder durch allogene Zellen stimuliert.

Der MAK 12V9.1 (IgG₁) markierte speziesübergreifend annähernd alle Leukozyten von Schwein, Pferd, Mensch und Rind. Die meisten anderen MAK reagierten mit Leukozyten vom Pferd ähnlich hoch wie mit denen des Schweines, mit den Leukozyten des Rindes deutlich schwächer und mit denen des Menschen reagierten sie fast nicht. Ebenfalls ein Marker für alle Lymphozyten ist 16V6.9 (IgG_{2b}), der auch einen großen Teil von Granulozyten, Thymus- und Milzzellen erkennt.

Eine Gruppe von fünf MAK (16V22.10, 16V23.2, 16V24.2, 16V25.2 und 16V107.11, alle IgG₁) markierte annähernd alle T-Lymphozyten, einen Teil der plastikadhärenten Makrophagen und einen kleineren Teil Thymus- und Milzzellen. Con A-Blasten wurden durch diese MAK zu einem geringeren Prozentsatz als die Kontrollzellen markiert.

Für einen B-Lymphozytenmarker spricht die Markierungsrate von 16V41.1 (IgG₁) in den Anreicherungen für T- und B-Zellen, da der Prozentsatz von 16V41.1-positiven Zellen ähnlich hoch ist wie der Anteil der Protein A-positiven Zellen und sich gleichmäßig mit der Protein A-Markierung verändert. Die gleichmäßige Reduktion aller funktionellen Versuche zeigt die Beteiligung der durch 16V41.1 markierten Zellen.

Die beiden Thrombozytenmarker 16V15.5 und 16V15.10 (beide IgG₁) markieren auch etwa 8 % der peripheren mononukleären Zellen.

Eine andere Gruppe von fünf MAK (12V8.4, 15V23.9, beide IgM, 15V28.2, 16V83.15 und 16V88.6, jeweils IgG₁) haben die gemeinsame Eigenschaft, verstärkt an Con A-Blasten zu binden. Ihre Markierungsraten an peripheren Lymphozyten reichen von 0,9 bis 24,6 %; Milzzellen markieren sie zu 4,6 bis 6,1 % und alle anderen Populationen markieren sie nicht. Mit keiner der angewandten Methoden ließen sich die durch diese MAK markierbaren Zellen anreichern.

Die Zytotoxozität der meisten MAK blieb deutlich unter der Markierungsrate, trotzdem wurde die mitogene Stimulation durch Con A weitgehend gehemmt.

Die Beeinflussung der Stimulationen durch die Mitogene PWM und PHA und der MLR ließ für die Marker der T-Zellen und der Con A-Blasten Abhängigkeiten von dem Titer der Zellkulturüberstände und der Markierungsrate erkennen.

Zur vollständigen Charakterisierung gehört die noch durchzuführende Bestimmung der gebundenen Antigene der Lymphozyten. Weiterhin erscheint es notwendig, den Einfluß der MAK auf die Effektorfunktionen von Lymphozyten zu untersuchen.

Summary

Characterization of Mab's against differentiation-antigens of porcine PBL's

The initial characterization of 15 Mab's reactive with porcine lymphocytes is described. The Mab's were produced by fusion between myeloma- and spleencells from Balb/c-mice immunized with porcine PBL's. The Mab's, IgM as well as IgG, should facilitate the differentiation between distinct subpopulations of lymphocytes in the pig.

The lymphocytes were separated via E-rosette-forming, filtration through nylon-wool, panning and adherence to plastic surfaces and than marked with the Mab's and determined by Cytofluorography.

To see whether the Mab's have any influence on functionally distinct PBL's, they were treated with Mab and complement before stimulating them with mitogens or in the MLR. Generally the cytotoxicity of the Mab's was lower than the percentage of marked cells, as determined by Cytofluorography.

The Mab 12V9.1 (IgG₁) detected almost all leucocytes not only of the pig, but also of the horse, man and cattle. Nearly all other Mab's reacted with the same percentage of leucocytes of the horse, as they did with that of the pig. They reacted weakly with the leucocytes from cattle and with none of man.

Another marker for all leucocytes was 16V6.9 (IgG_{2b}) which reacted with a high percentage of cells from the thymus and spleen, too.

Five Mab's (16V22.10, 16V23.2, 16V24.2, 16V25.1 and 16V107.11, all IgG₁) marked almost all T-lymphocytes, many macrophages and a few thymo- and spleenocytes. With Con A-Blasts they reacted weaker as they did with untreated cells.

16V41.1 obviously recognized B-lymphocytes, because it marked the same percentage of cells in PBL and in enriched fractions of T- and B-cells as Protein A does.

Its influence on functional assays showed the importance of the marked cells for proliferation.

Two Mab's were specific for platelets and reacted with about 8 % of peripheral mononuclear cells.

A group of five Mab's (12V8.4, 15V23.9, both IgM, 15V28.2, 16V83.15 and 16V88.6 all IgG₁) reacted in a higher percentage with Con A-blasts than with untreated cells. With PBL they reacted within 0.9-24.6 % and with 4.6-6.1 % spleenocytes, but with no other cells. None of the techniques used for enrichment led to a higher percentage of cells positive for these Mab's.

All Mab's suppressed the Con A-stimulation in a high degree.

The influence on the stimulation by PWM and PHA and on the MLR seemed to depend on the concentration of the Mab's in the supernatant and on the percentage of marked PBL's.

For further characterization of these Mab's the determination of the precipitated antigen is recommended. The study of their influence on effector-functions of PBL's is necessary, too.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Baker, P.J., Barth, R.F., Stashak, P.W., Amsbaugh, D.F. (1970a): Enhancement of the antibody response to type III pneumococcal polysaccharide in mice treated with anti-lymphocyte serum. *Journal of Immunology*, 104, 1313-1315
- Baxi, P.U., Milon, A., Franz, J., Metzger, J.J. (1980): Use of fluorescein conjugated Staphylococcal Protein A as a labelling agent for porcine lymphocytes. *Journal of Immunological Methods*, 35, 249
- Benacerraf, B., Germain, R. (1978): The immune response genes of the major histocompatibility complex. *Immunological Review*, 38, 70-119
- Binns, R.M., Licence, S.T., Gurner, B.W., Coombs, R.R.A. (1983): The demonstration of sIg, MHC and T cell antigens and Fc receptors on the lymphocyte surface by anti-globulin rosetting reactions: some technical considerations. *Journal of Immunological Methods*, 63, 69-80
- Boyse, E.A., Miyazawa, M., Aoki, T., Old, L.J. (1968): Ly-A and Ly-B: Two systems of lymphocyte isoantigens in the mouse. *Proc. R. Soc. B* 170, 175-193
- Böyum, A (1968): Separation of leucocytes from blood and blood marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, suppl. 97
- Bradley, B.A., Edwards, J.M., Franks, D. (1973): Histocompatibility phenotyping by the mixed lymphocyte

- reaction. Tissue Antigen, 3, 340-347
- Brenner, R., Hijmans, W., Haaijman, J.J. (1981). The bone marrow: The major source of serum Ig, but still a neglected site of antibody formation. Clin. exp. Immunol., 46, 1
- Brodsky, F.M., Parham, P., Barnstable, C.J., Crumpton, M.J., Bodmer, W.F. (1979): Monoclonal antibodies for analysis of the HLA system. Immunological Reviews, 47, 3-61
- Brodsky, F.M., Parham, P. (1982): Evolution of HLA antigenic determinants species cross-reactions of monoclonal antibodies. Immunogenetics, 15, 151-166
- Brondz, B., Karaulow, Abronina, I., Blandova, Z. (1980): Biological, immunological and genetic characterization of specific suppressor T cells and their receptors immune to antigens of the H-2 complex. Molec. Immunol., 17, 833-849
- Buschmann, H., Pawlas, S. (1980a): A study of porcine lymphocyte populations. I. Separation of porcine lymphocyte subpopulations. Vet. Immunol. Immunopathol., 1, 215-224
- Buschmann, H., Pawlas, S. (1980b): A study of porcine lymphocyte populations. II. Characterization of porcine lymphocyte populations. Vet. Immunol. Immunopathol., 1, 225-241
- Buschmann, H. (1984): Die Trennung und Differenzierung von Immunkompetenten Zellen bei Schwein und Rind. Zbl. Vet. Med. B. 31, 603-633

- Cooper, M.D., Peterson, R.D.A., South, M.A., Good, R.A. (1966): The function of the thymus system and the bursa system in the chicken. *Journal of Exp. Med.* 123, 75-102
- Cwik, S., Weber-Oechsner, K., Schmidt, D.O. (1981): B-Lymphozytenantigene beim Schwein und ihr Nachweis. *Zbl. Vet. Med. B*, 28, 310-318
- Damle, N.K., Fishwild, D.M., Engleman, E.G. (1985): Antigen-specific T lymphocytes in man make use of the same set of surface molecules as do cytolytic T lymphocytes: Roles of Leu-2/T8, Leu-4/T3, Leu-5/T11, LFA-1 molecules. *Journal of Immunology*, 135, No. 3, 1724-1730
- Eichmann, K., Rajewsky, K. (1975): Induction of T and B cell immunity by anti-idiotypic antibody. *Eur. J. Imm.*, 5, 661-666
- Escajadillo, C., Binns, R.M. (1975a): Rosette formation with sheep erythrocytes - a possible T cell marker in the pig. *Int. Archs. Allergy appl. Imm.*, 48, 261-275
- Escajadillo, C., Binns, R.M. (1975b): Rosette formation of pig T lymphocytes with sheep erythrocytes - further data. *Int. Archs. Allergy appl. Imm.*, 49, 325-331
- Evans, R.L., Wall, D.W., Platsoucas, C.D., Siegal, F.P., Fikrig, S.M., Testa, C.M., Good, R.A. (1981): Thymus-dependent membrane antigens in man: Inhibition of cell mediated lympholysis by monoclonal antibody to T_{H2} antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 544-548

- Germain, R., Theze, J., Kapp, J., Benacerraf, B. (1978):
Antigen-specific T cell mediated suppression. I.
Induction of L-glutamic acid-L-alanine-L-tyrosine
specific suppressor T cells in vitro requires both
antigen-specific T cell suppressor factor and anti-
gen. J. exp. Med., 147, 123-136
- Germain, R., Benacerraf, B. (1981): A single major path-
way of T lymphocyte interactions in antigen-specific
immune suppression. Scand, J. Imm., 13, 1-10
- Hammerberg, C., Schurig, G.G. (1986): Characterization
of monoclonal antibodies directed against swine leu-
kocytes. Vet. Immunol. Immunopath., 11, 107-121
- Jonjic, S., Koszinowski, U.H. (1984): Monoclonal anti-
bodies reactive with swine lymphocytes. I. Antibodies
to membrane structures that define the cytolytic
T lymphocyte subset in the swine. Journal of Immu-
nology, 133, No. 2, 647-652
- Julius, M.H., Simpson, E., Herzenberg, L.A. (1973):
A rapid method for the isolation of functional
thymus-derived murine lymphocytes. Eur. J. Immunol.,
3, 645-649
- Klein, J. (1975): Biology of the mouse histocompatibi-
lity-2 complex. Springer Verlag, New York
- Klein, J., Juretic, A., Baxevanis, C.N., Nagy, Z.A.
(1981): The traditional and a new version of the
mouse H-2 complex. Nature, 291, 455
- Köhler, G., Milstein, C. (1975): Continuous cultures of
fused cells secreting antibody of predefined speci-
fity. Nature, 256, 495-497

- Kuritani, T., Cooper, M.D. (1982): I. Analysis of immunoglobulin heavy chain switching using monoclonal anti-immunoglobulin M, G, A, antibodies and Pokeweed Mitogen-induced Plasma Cell Differentiation. J. Exp. Med., 155, 839-851
- LeBien, T.W., Kersey, J.H. (1980): A monoclonal antibody (TA-1) reactive with human T-lymphocytes and monocytes. Journal of Immunology, 125, 2208
- Litman, G.W., Kehoe, J.M. (1978): The phylogenetic origins of immunoglobulin structure, in: Comprehensive Immunology, (eds) Good, R.A., Day, S.B.
- Loken, M.R., Herzenberg, L.A. (1975): Analysis of cell populations with a fluorescence activated cell sorter. Ann. NY. Acad. Sci., 254, 163
- Lonai, P., Puri, J., Hammerling, G. (1981): H-2 restricted antigen binding by a hybridoma clone that produces antigen-specific helper factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 549-553
- Lunney, J.K., Sachs, D.H. (1978): Transplantation in miniature swine. IV. Chemical characterisation of MSLA and Ia-antigens. Journal of Immunology, 122, 607-612
- Lunney, J.K., Sachs, D.H. (1979): Transplantation in miniature swine. V. Characterisation of Ia-antigens. Journal of Immunology, 122, 623-627
- McDonald, H., Cerottini, J., Ryser, J., Marijanski, J., Taswell, C., Widmer, M., Brunner, K. (1980): Quantitation and cloning of cytolytic T lymphocytes and their precursors. Immunol. Review, 51, 93-123

- McNamara, M., Chang-Yuil Kang, Kohler, H. (1985): Analysis of a T_{H1} - T_{H2} helper cell circuit. Journal of Immunology, 135, 1603-1609
- Mierau, R., Cramer, M. (1985): COB6-3, a monoclonal mouse allo-antibody reacting with H-2D^b region encoded molecules, shows a monomorphic specificity for HLA-A, B, C antigens. XVIIth Meeting of the Society of immunology, in: Immunobiology, 170, Nr. 12/85
- Miller, J.F.A.P. (1980): MHC restrictions in cellular cooperation. Prog. Immunol., 4, 359-374
- Mitchinson, N.A., Rajewsky, K., Taylor, R.B. (1970): Cooperations of antigenic determinants and of cells in the induction of antibodies. In: Developmental aspects of antibody formation and structure, pp. 547-561, Sterzl, J. and Riha, I. (eds.), Academic Press New York
- Mozes, E., Haimovitch, J. (1979): Antigen-specific T cell helper factor cross reacts idiotypically with antibodies of the same specificity. Nature, 278, 56-57
- Ortaldo, J.R., Sharrow, S.O., Timonen, T., Herberman, R.B. (1981): Determination of surface antigens on highly purified human Nk cells by flow cytometry with monoclonal antibodies. Journal of Immunology, 127, 2401-2409
- Pescovitz, M.D., Lunney, J.K., Sachs, D.H. (1984): Preparation and characterisation of monoclonal antibodies reactive with porcine PBL. Journal of Immunology, 133, 368-375

Pierce, C.W., Kapp, J.A., Benacerraf, B. (1976): Regulation by the H-2 complex of macrophage-lymphoid cell interactions in secondary antibody response in vitro. J. exp. Med., 144, 371-381

Pierres, M., Mercier, P., Madsen, M., Mawas, C., Kristensen, T. (1982): Monoclonal mouse anti-I-A^k and anti-I-E^k antibodies cross-reacting with HLA-DR supertypic and subtypic determinants rather than classical DR allelic specificities. Tissue Antigens, 19, 289-300

Playfair, J.R.A. (1982): Immunology at a glance. Blackwell Scientific Publications, Oxford

Reif, A.E., Allen, J.M.V. (1964): The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissues. J. exp. Med., 120, 413

Reinherz, E.L., Schlossman, S.F. (1980): The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell, 19, 821-827

Rich, S., David, C. (1979): Regulatory mechanisms in cell-mediated immune response. VIII. Differential expression of I region determinants by suppressor cells and their targets in suppression of mixed leukocyte reactions. J. exp. Med., 150, 1108-1121

Roitt, I. (1984): Essential immunology, Phylogeny of the immune response. pp. 123-125. Cooperation between T- and B-cells, pp. 67-68. 5th edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford

Schreffler, D.C., David, C.S. (1975): The H-2 histocompatibility complex and the I immune response region:

- genetic variation, function and organization. Adv. Imm., 20, 125-195
- Sharon, N. (1983): Lectin receptors as lymphocyte surface markers. Adv. Imm., 34, 213-298
- Shinohara, N., Sachs, D.H. (1981): Phylogenetic tracing of Ia gens. Nature, 292, 362
- Strassmann, G., Eshhar, Z., Mozes, E. (1980): Genetic regulation of delayed-type hypersensitivity responses to poly (L-tyr,L-glo)-poly(DL-ala)-poly(L-lys). II. Evidence for T-T cell collaboration in delayed type hypersensitivity responses and for a T cell defect at the efferent phase in nonresponder H-2^k mice. J. exp. Med., 151, 628-636
- Symons, D.B.A., Clarkson, C.A. (1980): The binding of LPS to the lymphocyte surface. Immunology, 38, 503-508
- Timonen, T., Saksela, E. (1980): Isolation of human natural killer cells by density gradient centrifugation. J. Immunol. Methods
- Tokuhisa, T., Taniguchi, M., Okumura, K., Tada, T. (1980): An antigen-specific I region gene product that augments the antibody response. Journal of Immunology, 120, 414-421
- Vaickus, L., Levy, R. (1985): Antiproliferative monoclonal antibodies: Detection and initial characterization. Journal of Immunology, 135, 1987-1997
- Wagner, H., Röllinghoff, M. (1978): T-T cell interactions during in vitro cytotoxic allograft responses.

I. Soluble products from activated $\text{Ly}1^+$ T cells trigger autonomously antigen-primed $\text{Ly}23^+$ T cells to cell proliferation and cytolytic activity.

J. exp. Med., 148, 1523-1538

Wagner, H., Rölinghoff, M., Pfizenmaier, K., Hardt, K., Johnscher, G. (1980): T-T cell interactions during in vitro cytotoxic T lymphocyte CTL responses. II. Helper factor from activated $\text{Lyt}1^+$ T cells is rate limiting (i) in T cell responses to nonimmunogenic alloantigen. (ii) in thymocyte responses to allogeneic stimulator cells. (iii) recruits allo- or H-2 restricted CTL precursors from the $\text{Lyt}123^+$ subset. Journal of Immunology, 124, 1058-1067

Wysocki, L.J., Sato, V.L. (1978): "Panning" for lymphocytes: A method for cell selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2844-2845

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. A. Mayr recht herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin danken.

Herrn Prof. Dr. H.G. Buschmann möchte ich für die Überlassung des Themas und für die jederzeit großzügig gewährte Unterstützung meinen großen Dank aussprechen.

Allen Angehörigen des Instituts, insbesondere den Mitarbeitern unserer Abteilung, Frau Dr. A. Kleinschmidt, Frau T. Holy und Frau R. Schmidt, sei für die stets fruchtbare Anteilnahme an dieser Arbeit besonders herzlich gedankt.

Meine Familie war stets ein Rückhalt in dieser Zeit.

Lebenslauf

- 1957 geboren am 10. Mai als 4. Kind des Justiz-
 amtmanns Erich Koepfel und seiner Ehefrau
 Anneliese, geborene Schneider
- 1963 Eintritt in die Volksschule
- 1967 Übertritt auf das humanistische Gymnasium
 Fridericianum in Erlangen
- 1976 Abitur am Gymnasium Fridericianum
- 1976-1977 Grundwehrdienst
- 1980 Zulassung zum Studium der Veterinärmedizin
 in München
- 1985 im Juni Beginn der vorliegenden Arbeit
- 1986 im März Staatsexamen
 im April Approbation als Tierarzt

